

На правах рукописи

Олабоде Ифараджими Рафеал

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ
ОТИТОВ У МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ**

Специальность: 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология,
фармакология и токсикология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2025

Работа выполнена в департаменте ветеринарной медицины аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН)

Научный руководитель:

Сачивкина Надежда Павловна, доцент департамента ветеринарной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Пименов Николай Васильевич, заведующий кафедрой иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина», доктор биологических наук, профессор, профессор РАН

Концевая Светлана Юрьевна, заведующий кафедрой агробиотехнологий ФГБОУ ДПО «Российская академия кадрового обеспечения агропромышленного комплекса», доктор ветеринарных наук, профессор

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»

Защита состоится 11 июня 2025 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.003 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2.

С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном информационно-библиографическом центре Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Автореферат диссертации размещен на сайтах: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>, <https://www.rudn.ru/science/dissovet>

Автореферат диссертации разослан «___» апреля 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат ветеринарных наук
доцент

Семёнова Валентина Ивановна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Отиты у мелких домашних животных - тяжело протекающее заболевание, снижающее качество их жизни, являются каждодневной практикой ветеринарных врачей и постоянной тематикой конференций, посвященных вопросам хирургической инфекции. При этом данная патология в большинстве случаев спровоцирована дрожжеподобным грибом *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*, МР) (Kiss G. et al. 1996; Bond R. et al. 2010). По данным ряда авторов, в мире ежегодно отмечается рост частоты поражений малассезиозами (М) у собак (Ершов П.П., 2008; Пустовит Е.А., Пименов Н.В. с соавт., 2024; Crespo M.J. et al. 2002; Hobi S. et al. 2022). В первую очередь поражаются кожа и ее производные, вторично в патологический процесс вовлекаются нервная, эндокринная, выделительная и другие системы организма. Весьма вариабельный по своим клиническим проявлениям, малассезиоз часто проходит под другими диагнозами. Традиционные методы медикаментозной терапии таких животных неэффективны в плане достижения полной ремиссии, поэтому особенно важен поиск новых препаратов, позволяющих проводить эффективную терапию (Buommino E. et al. 2016; Bajwa J. et al. 2023). Несмотря на то, что современная антимикотическая терапия достаточно эффективна против острой инфекции, лечение хронического рецидивирующего отита, осложненного малассезиозом, не всегда эффективно (Brito E.H.S. et al. 2007; Weiler C.B. et al. 2013; Theelen V. et al. 2017). Так, при назначении системных антимикотиков частота излечения в острой фазе обычно составляет 60-80% (Li W. et al. 2020); при этом рецидивы заболевания наблюдаются в течение 6 месяцев у 20–22% собак (Guillot J. et al., 1999; Ilahi A. et al., 2018). Эти неутешительные прогнозы в большинстве случаев связаны с нарастающей резистентностью возбудителей к антимикотическим средствам. В связи с этим, возникает необходимость поиска альтернативных путей этиотропной терапии купирования хирургической инфекции и как один из ярких проявлений отитов (Кудинова С.А., Луцай В.И. с соавт. 2021). Возможным перспективным направлением такого поиска является изучение фитопрепаратов, воздействующих на дрожжеподобные грибы (ДПГ) или на их чувствительность к антимикотикам.

Степень разработанности. Изучением малассезиоза у животных занималась целая плеяда исследователей (Маноян М.Г., Ершов П.П., с соавт. 2006; Aiemsaard J. et al. 2019; Schlemmer K.B. et al. 2019; Sim J.X.F. et al. 2019; Puigdemont A. et al. 2021; Vercelli C. et al. 2021; Angiolella L. et al. 2023; Scheler J. et al. 2024), которые изучили его распространение, причины возникновения, патогенез и схемы терапии. В последние годы интерес к лечению инфекций *M. pachydermatis* натуральными растительными продуктами значительно возрос в связи с растущей резистентностью к противогрибковым препаратам (Bismarck D. et al. 2020; Ebani V.V., Mancianti F. 2020). По данным Duarte, E.R. et al. 2002, значительная частота рецидивов отита, вынуждает врачей продлевать схему лечения или увеличивать дозу антимикотика. По данным Gupta, A.K. et al. 2000, продление периода лечения может лишь сместить вероятность рецидива малассезиоза во времени, а увеличение дозы препарата приводит к дополнительным побочным эффектам. Проблема противорецидивной терапии осложняется еще и тем, что при широком применении препаратов из группы азолов может развиваться резистентность М к ним (Morris D.O. et al. 2004; Lyskova P. et al. 2007; Cordeiro B. et al. 2022). Поэтому исследование новых противогрибковых препаратов, улучшение терапевтических схем и их влияние на вирулентность приводящих, являются актуальными в ветеринарии.

Цель исследования: оценить потенцирующее действие фитопрепарата Фарнезола по отношению к современным антимикотическим средствам в комплексном лечении острого малассезиозного отита.

Для достижения намеченной цели перед нами были поставлены **следующие задачи:**

1. Изучить свойства штаммов *Malassezia pachydermatis* сопутствующую

бактериальную флору от клинически больных собак и кошек с малоссегиозным отитом;

2. Исследовать способность Фарнезола разрушать биопленки *M. pachydermatis in vitro* и усиливать действие противогрибковых средств;

3. Оценить эффективность моделей *in vivo* с инфекцией *M. pachydermatis*;

4. Определить влияние Фарнезола на процесс лечения малоссегиозного отита у кроликов

5. Доказать, усиливающее действие Фарнезола антимикробных средств на модели малоссегиозного отита.

Научная новизна. Впервые доказана корреляция между устойчивостью штаммов *Malassezia pachydermatis* к современным антимикотикам и способностью образовывать биопленки. Для этого были выбраны наиболее сильные продуценты биоплёнок (оптическая плотность выше 0,4) и наиболее устойчивые штаммы к антимикотикам (резистентность наблюдалась к 7 препаратам из 8). Проведен анализ видового разнообразия микроорганизмов при малоссегиозном отите: у собак *M. pachydermatis* чаще выделялся со стафилококками и стрептококками, а у кошек - с энтеробактериями и стафилококками. Впервые установлены максимальные величины индекса адгезии *M. pachydermatis* ($8,28 \pm 0,62$) и коэффициента адгезии ($70,62 \pm 4,91\%$) к буккальному эпителию собак. Впервые установлены максимальные величины фагоцитарного индекса *M. pachydermatis* ($83,1 \pm 2,7\%$) и фагоцитарного числа ($9,4 \pm 1,1$) к альвеолярным макрофагам крыс. Предложена оригинальная модель острого малассегиозного отита на кроликах. Доказано терапевтическое и противорецидивное действие Фарнезола в экспериментах *in vivo*. Определены эффективные концентрации Фарнезола (12,5-200 мкМ/мл), приводящие к снижению биоплёнок *M. pachydermatis* на 55-71%. Доказано, что Фарнезол в дозе 25-200 мкМ/мл усиливает действие антимикотиков (Амфотерицина В, Нистатина, Вориконазола и Кетоконазола) или заново активизирует препарат, который перестал воздействовать на возбудителя (Клотримазол). Установлено, что при добавлении Фарнезола в схему лечения отитов грибковой этиологии у собак приводило к уменьшению гиперемии, зуда, отека, гнойного экссудата на 5-7-й сутки лечения, а полное клиническое выздоровление животных наступало к 10-14 дню терапии. При этом регистрировали увеличение количества гемоглобина в 1,22 раза, снижение числа лейкоцитов в 1,30 раза, на фоне снижения показателей эозинофилов в 1,42 раза и палочкоядерных нейтрофилов в 1,41 раза, в опытной группе после лечения, при сравнении с контролем.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана эффективная технология моделирования *M. pachydermatis* у лабораторных животных. Предложенная схема лечения малассегиозного отита, позволяет добиться видимого клинического улучшения, превышающего скорость заживления современными препаратами в ветеринарии. Препарат Фарнезол природного происхождения может быть как основным, так и дополнительным терапевтическим средством, предназначенным для лечения малассегиозного отита у собак и кошек и профилактики его рецидивов. Включение Фарнезола в схему лечения можно рассматривать как альтернативу применению антимикотиков в случае развития резистентности к ним. В ходе работы собрана рабочая коллекция штаммов *M. pachydermatis*, которая будет использована в дальнейших исследованиях департамента ветеринарной медицины, по изучению антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами разных видов.

Методология и методы исследования. Тема диссертации является частью научно-исследовательской работы департамента ветеринарной медицины аграрно-технологического института РУДН. При проведении исследований использовали методы патентного поиска, анализ, сравнение, обобщение, манипуляции при терапии и статистический анализ. Методы исследования – клинические, биохимические, микробиологические, морфологические и статистический анализ экспериментальных данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее агрессивный клинический штамм *M. pachydermatis* Cd23 был отобран по

способности образовывать биопленки, устойчивости к противогрибковым препаратам, способности адгезироваться к эпителиальным клеткам и фагоцитироваться макрофагами.

2. Малассезиозный отит воспроизводится на лабораторной модели кролика путем заражения ушной раковины агрессивным штаммом дрожжеподобных грибов без предварительной обработки антибиотиками и эстрадиолом.

3. На лабораторной модели малассезиозного отита продемонстрирован терапевтический эффект Фарнезола в сочетании с современными противогрибковыми препаратами, заключающийся в быстрой санации уха в течение месяца и восстановлении показателей крови кроликов до нормы.

4. Терапевтический эффект Фарнезола установлен за счет частичной гибели популяции дрожжеподобных грибов в результате их лизиса и снижения способности к образованию биопленок.

5. Доказано, что Фарнезол усиливает действие противогрибковых средств, что может служить альтернативой поиску новых лекарственных препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов проведенных исследований, правомочность основных положений работы, выводы и предложения обоснованы достаточным количеством животных в экспериментальных группах, изучением отечественной и иностранной литературы по теме исследования, клинические, микробиологические, морфологические, биохимические данные получены с использованием современных методов на сертифицированном оборудовании с последующей статистической обработкой и анализом полученных результатов, актами о проведении исследований. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на заседаниях департамента ветеринарной медицины АТИ РУДН (2021-2023 гг.), XV Международной НПК молодых ученых «Инновационные процессы в сельском хозяйстве» РУДН (апрель 2023 г.); XXV Всероссийской студенческой НПК Нижневартковского государственного университета, г. Нижневартовск (апрель 2023 г.); Международной научной студенческой конференции (МНСК-2023) г. Новосибирск (апрель 2023 г.); VII Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии - XXVI Кашкинских чтениях. Санкт-Петербург (июнь 2023 г.).

Публикации. Основные положения диссертационной работы изложены в 7 научных работах, из которых 2 — в рецензируемых изданиях, рекомендованных перечнем ВАК, и 2 — в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Основное содержание работы изложено на 125 страницах, рукопись состоит из введения, обзора литературы, основного содержания работы, включая материалы и методы, результаты собственных исследований, анализа и обсуждения результатов исследований, а также заключения и списка литературы. Список литературы включает 157 источников. Работа иллюстрирована 34 таблицами и 24 рисунками.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1. Материалы и методы. Исследования проведены в департаменте ветеринарной медицины аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» на протяжении 2021-2024 гг. Эксперименты *in vivo* и отбор биоматериала проводили в соответствии с Международными биоэтическими нормами, положениями IV Европейской Конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (ETS 123, 1986), законодательными актами РФ по проведению экспериментальных работ. Для наших работ (Рисунок 1). использовали дрожжеподобные грибы, полученные клиническим путем. Для этого было исследовано 76 случаев наружного отита у собак и 10 случаев отита у кошек в клиниках гор. Москвы, из них в 30 случаях у собак и в 5 случаях у кошек подтвержден отит с этиологией *Malassezia pachydermatis*. Установлены клинические формы отитов у собак и кошек: эритематозный отит, эритематозно-церуминозный, церуминозный отит и его пролиферативная форма.

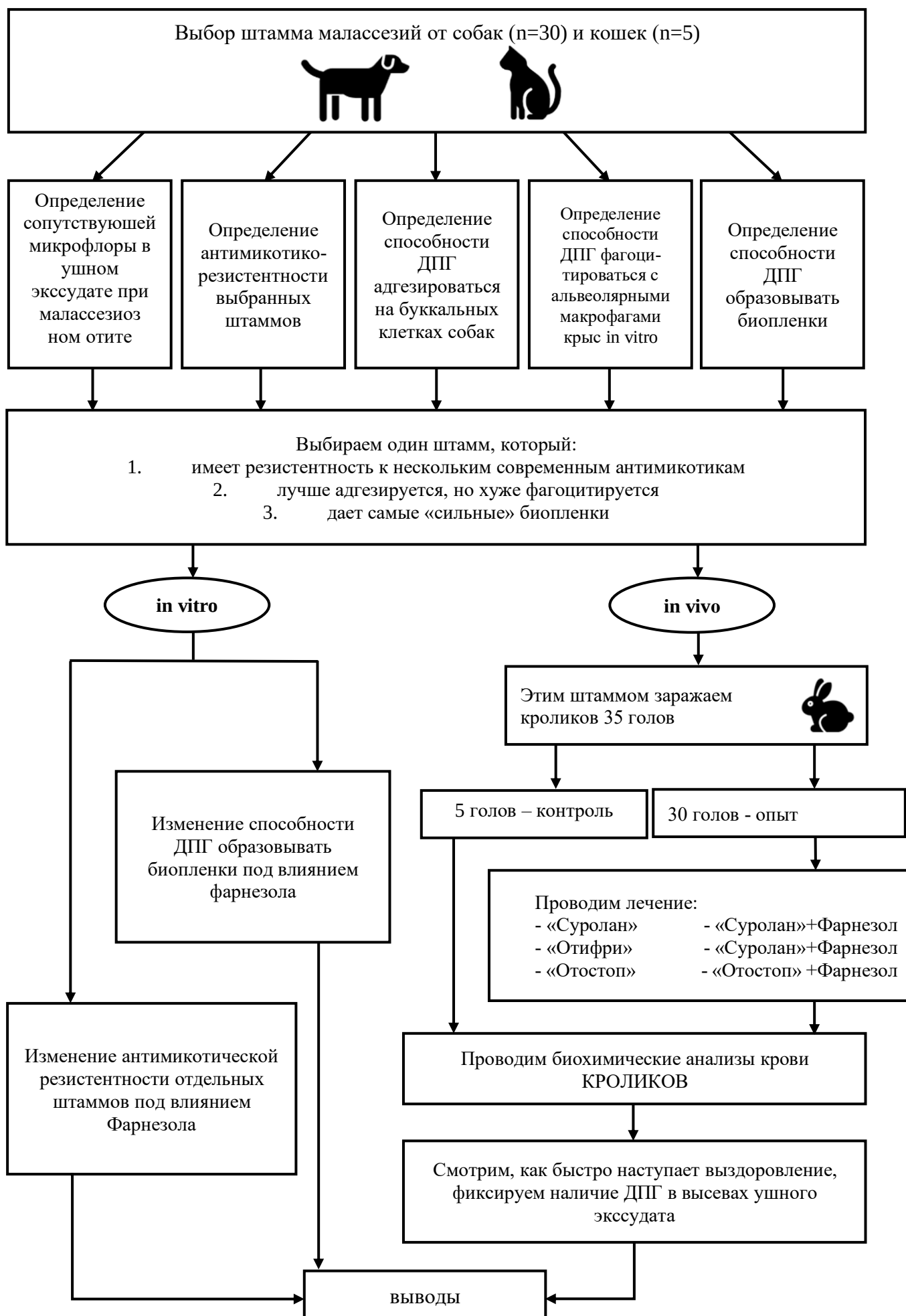


Рис. 1. План исследования.

Предварительную идентификацию штаммов хирургической инфекции, до уровня рода проводили по морфологическим, культуральным свойствам. Окончательную идентификацию проводили с помощью технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации «Bruker Daltonik MALDI Biotyper». В исследовании количественного и качественного микробного состава использовали следующие питательные среды: на грибы - жидкую и твердую среды Сабуро (BioMerieux, Франция) с добавлением глюкозы, пенициллина и стрептомицина 100 МЕ/л; агар Сабуро Хлорамфеникол 2 (BioMerieux, Франция); «Сердечно-мозговой бульон» (HiMedia, Индия); Агар Сабуро с декстрозой Sabouraud Dextrose Agar Eur. Pharm. (Conda, Испания); Агар Сабуро с декстрозой (HiMedia, Индия); на другие микроорганизмы - Эндо, МПА, МПБ, Ресселя, питательная среда Блаурокка, МРС, висмутсульфитный агар, желточно-солевой агар и др. (HiMedia, Индия и Оболенск, Россия) (Руденко П.А. с соавт. 2021). Денситометрические показатели микробных биопленок исследовали по запатентованному методу Ленченко Е.М. с соавт. 2024. Для определения чувствительности МР к антимикотическим препаратам использовали диско-диффузионный метод Кирби-Бауэра (Honnar P. et al., 2016; Puigdemont A. et al., 2021). Все штаммы, выделенные от животных с наружным отитом, были классифицированы как восприимчивые (S) – 1 балл, промежуточные (I) – 2 балла; или устойчивые (R) – 3 балла в соответствии с контрольными точками производителя для ДППГ. Эти баллы были введены в таблицу и рассчитаны как Степень устойчивости (Dr) к противогрибковым препаратам (результатирующий знак) для статистического анализа критерия хи-квадрат. Адгезивные свойства МР к эпителиоцитам и определение способности грибов к фагоцитозу определяли по методам, описанными Сачивкиной Н.П. в 2010 году. Для первого опыта использовали буккальные эпителиоциты (БЭ) здоровой собаки. Определяли следующие показатели: К - % БЭ с адгезированными МР; индекс адгезии (ИА) - количество ДППГ на одном БЭ относительно числа активных эпителиоцитов (показатель, характеризующий адгезивность МР. Для второго опыта использовали альвеолярные макрофаги (АМ) крыс. Для проведения эксперимента использовали 20 белых крыс обоего пола, весом 120-160 г. Определяли такие показатели как фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) и индекс переваривающей способности (ИПС). Опыты повторяли трижды.

В эксперименте использовали 35 взрослых самцов кроликов породы Советская шиншилла, возрастом 1 год, массой 5,5 кг. Для заражения готовили взвесь МР $1,5 \times 10^8$ клеток/мл. Внутренняя поверхность уха скарифицировалась стерильным лезвием и на эти царапины наносили 1 мл взвеси микроорганизмов. У животных фиксировали следующие клинические признаки: обильное выделение ушной серы (серы) желто-коричневого цвета, часто с неприятным запахом, различной степени выраженности: от легкой до очень тяжелой; эритема; зуд; изменение цвета кожи; диарея; потеря массы тела; тремор. Анализ крови и сыворотки проводили на гематологическом анализаторе (прибор Chem Analyzer, Испания) с помощью диагностического набора (BioMed Diagnostics, Германия). Наступление полного выздоровления у кроликов и отслеживание рецидивов заражения *Malassezia* подтверждали бактериологическим методом. Ушной экссудат наносили на поверхность питательной среды Сабуро и культивировали при температуре 37°C в течение 48-72 часов. Результаты учитывали по наличию (подсчёт КОЕ) или отсутствию роста. Влияние различных концентраций Фарнезола на биопленки МР изучали *in vitro* в плашках по изменению плотности биопленок (Сачивкина Н.П. и др. 2020).

В клиническом исследовании задействованы 30 собак разных пород, пола и возраста от 1 до 10 лет. Животных разделили на 2 группы: опытную (n=15) и контрольную (n=15). Опытной группе были назначены капли ушные ветеринарные Суrolан производства фирмы Elanco Animal Health (Индиана, США). Форма – суспензия, действующее вещество – полимиксин В, преднизолон, миконазол, 2 раза в день, в течение 14 дней. Плюс раствор препарата Фарнезол (Far) (Sigma-Adrich, США), который заранее готовился в концентрации фарнезола 100 мкМ на мл, разведение проводили в стерильном физиологическом растворе (ФР) pH 7,0. После применения капель Суrolана наносили Фарнезол в виде спрея тоже

дважды в день. Контролем служила группа животных, которым был назначен только препарат Суrolан.

Статистически все результаты были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM) не менее трех повторов. Просчитывали критерий «хи-квадрат» в таблицах сопряженности, где строки таблицы соответствуют оптической плотности, а столбцы резистентности микроорганизмов. Данные по этим двум критериям были предварительно сгруппированы в интервалы. Статистическая значимость была установлена на уровне $p \leq 0,05$ и, где применимо, разница между образцами была оценена с помощью статистического программного обеспечения XLSTAT 2020 (Addinsoft Inc., Нью-Йорк, США). Влияние различных концентраций Фарнезола было оценено на степень образования биопленки с помощью логарифмически-логистического распределения. Эта модель была выбрана, поскольку предположение о пропорциональных рисках модели Кокса не соответствовало всем ковариатам. Все графики были построены с использованием Microsoft Excel (Microsoft Excel для Office 365 MSO, Microsoft COP., Redmond, WA, USA).

2.2. Результаты собственных исследований и их обсуждение

2.2.1. Изучение видового состава хирургической инфекции и биологических свойств микроорганизмов, выделенных при отите у собак и кошек. Проведен поиск при различных формах хирургической инфекции у мелких домашних животных микробного пейзажа, изолированного из гнойного экссудата. Однако грибы рода *Malassezia* были выделены лишь от собак и кошек при гнойных отитах. Поэтому дальнейший выбор направления исследования пал на изучение патогенетических особенностей течения малассегиозного отита. Штаммы МР были выделены от 30 собак разных пород, пола и возраста от 1 года до 14 лет и 5 кошек в возрасте от 7 месяцев до 10 лет. Состав сопутствующей микрофлоры ушного экссудата при малассегиозе собак и кошек представлен в табл. 1.

Таблица 1. Видовой состав сопутствующей-микрофлоры ушного экссудата при малассегиозе собак и кошек

Вид микроорганизмов	Образцы от собак (n=30)		Образцы от кошек (n=5)	
	Абс. число	%	Абс. число	%
<i>S. saprophyticus</i>	3	3,7	3	4,7
<i>S. intermedius</i>	5	6,1	2	3,1
<i>S. epidermidis</i>	1	1,2	1	1,6
<i>S. aureus</i>	5	6,1	2	3,1
<i>S. hyicus</i>	3	3,7	3	4,7
<i>S. faecalis</i>	6	7,3	4	6,3
<i>S. uberis</i>	1	1,2	1	1,6
<i>E. coli</i>	11	13,4	8	12,5
<i>P. aeruginosa</i>	3	3,7	2	3,1
<i>P. vulgaris</i>	2	2,4	3	4,7
<i>K. oxytoca</i>	3	3,7	2	3,1
<i>B. subtilis</i>	2	2,4	2	3,1
<i>L. plantarum</i>	5	6,1	4	6,3
<i>L. rhamnosus</i>	5	6,1	5	5,3
<i>L. xylosum</i>	3	3,7	1	1,2
<i>L. acidophilus</i>	4	4,9	4	6,3
<i>B. adolescentis</i>	2	2,4	3	4,7
<i>B. animalis</i>	4	4,1	5	7,8
<i>B. bifidum</i>	7	8,5	6	9,4
<i>C. albicans</i>	4	4,9	2	3,1
<i>T. mentagrophytes</i>	2	2,4	1	1,2
<i>M. canis</i>	1	1,2	-	-
ВСЕГО	82	100	64	100

Сравнивая микроорганизмы, выделенные из наружного слухового прохода собак вследствие инфицирования МР, нами установлено, что М в монокультуре выявлялись у собак в 13,3 %, у кошек - в 20,0 %, ассоциация с 1 видом бактерий - в 10,1 % у собак и в 20,0 % у кошек; ассоциация с 2 видами бактерий - в 6,6 % и 20,0 % соответственно; ассоциация с 3 видами бактерий - в 6,6 % и 0 %; ассоциация с 4 и более видами бактерий - в 16,7 % и 0 %; ассоциация с 1 видом грибов - в 6,6 % и 20,0 %; ассоциация с 1 видом грибов и 1 видом бактерий - в 6,6 % и 0 %; ассоциация с 1 видом грибов и 2 видами бактерий - в 10,1 % и 20,0 %; ассоциация с 1 видом грибов и 3 видами бактерий - в 10,1 % и 0 %; ассоциация с 1 видом грибов и 4 и более видами бактерий – 13,3 % и 0 %, соответственно. Следует отметить, что ассоциации МП у собак чаще всего были со стафилококками и стрептококками, а у кошек МП чаще всего высевали с энтеробактериями и стафилококками.

2.2.3. Денситометрические показатели биопленок *Malassezia pachydermatis* и их восприимчивость к антимикотикам. Денситометрические показатели выборки приведены в таблице 2. Согласно нашей градации, 2 (6,7%) штамма относятся к слабым продуцентам биопленок, 25 (83,3%) штаммов относятся к умеренным продуцентам и 3 (10%) к сильным – изоляты Cd23, Cd27 и Cd3.

Таблица 2. Определение интенсивности образования биопленок штаммов *Malassezia pachydermatis* собак (Cd1 – Cd30), кошек (Cc1 – Cc5) и их чувствительность к антимикотикам

Изолят	Оптическая плотность	Степень ОП	Антимикотики								Степень устойчивости
			NS	AP	KT	CC	VOR	FU	MIC	IT	
MP Cd1	0.203 ± 0.016	2	1	1	3	1	1	2	1	1	11
MP Cd2	0.351 ± 0.018	2	1	2	1	2	2	3	1	1	13
MP Cd3	0.400 ± 0.012	3	1	1	1	2	2	3	2	1	13
MP Cd4	0.287 ± 0.018	2	1	3	1	2	1	1	1	3	13
MP Cd5	0.261 ± 0.011	2	2	1	1	2	2	1	1	1	11
MP Cd6	0.312 ± 0.029	2	1	1	1	1	1	3	1	1	10
MP Cd7	0.255 ± 0.010	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8
MP Cd8	0.243 ± 0.026	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cd9	0.190 ± 0.016	1	1	3	1	1	1	3	1	2	13
MP Cd10	0.237 ± 0.015	2	2	1	1	1	1	1	2	2	11
MP Cd11	0.345 ± 0.011	2	1	1	3	1	2	2	1	1	12
MP Cd12	0.323 ± 0.017	2	1	2	1	1	2	1	1	1	10
MP Cd13	0.192 ± 0.012	1	1	1	1	2	1	2	1	1	10
MP Cd14	0.258 ± 0.011	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cd15	0.261 ± 0.010	2	1	1	2	2	1	1	1	2	11
MP Cd16	0.313 ± 0.007	2	1	1	1	1	1	2	1	1	9
MP Cd17	0.294 ± 0.019	2	1	1	3	1	1	3	1	1	12
MP Cd18	0.286 ± 0.020	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cd19	0.362 ± 0.014	2	2	1	2	2	1	1	1	1	11
MP Cd20	0.366 ± 0.015	2	1	2	1	1	3	1	1	1	11
MP Cd21	0.280 ± 0.016	2	1	2	1	1	1	1	3	1	11
MP Cd22	0.344 ± 0.018	2	1	1	1	1	1	2	1	1	9
MP Cd23	0.441 ± 0.016	3	2	3	3	2	2	3	1	2	18
MP Cd24	0.370 ± 0.015	2	1	1	2	2	1	1	1	1	10
MP Cd25	0.323 ± 0.017	2	2	1	1	1	1	2	3	2	13
MP Cd26	0.288 ± 0.012	2	1	2	1	1	1	1	1	1	9
MP Cd27	0.403 ± 0.026	3	1	2	2	1	3	1	1	1	12
MP Cd28	0.368 ± 0.014	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8
MP Cd29	0.297 ± 0.011	2	1	1	1	1	3	2	1	1	11
MP Cd30	0.353 ± 0.019	2	1	1	2	1	1	3	3	1	13
MP Cc1	0.278 ± 0.011	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cc2	0.211 ± 0.012	2	1	1	2	2	1	1	1	2	11
MP Cc3	0.219 ± 0.008	2	1	1	1	1	1	2	1	1	9
MP Cc4	0.280 ± 0.013	2	1	1	3	1	1	3	1	1	12
MP Cc5	0.226 ± 0.010	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9

Примечание: ОП контроля = 0.097 ± 0.005

Большинство штаммов МР были чувствительны (S) к противогрибковым препаратам. Однако было отмечено несколько исключений: три штамма были классифицированы как устойчивые (R) к AP, MIC и VOR; четыре R к KT; семь R к FU и только один R к IT. Нет результатов R для противогрибковых дисков NS и CC. Промежуточные результаты (I): 5 изолятов к NS, KT и IT; 6 к AP и VOR; 12 к CC; 7 к FU; 2 к MIC. Штамм МР Cd 23 был классифицирован как R к AP, KT и FU, I к NS, CC, IT и VOR, S только к MIC. Штамм МР Cd 27 был классифицирован как R к VOR, I к AP, KT и S к другим. Штамм МР Cd 3 был классифицирован как R к FU, I к CC, VOR и MIC. Статистически доказано, что существует достоверная связь между оптической плотностью биопленок МР и их чувствительностью к лекарственным препаратам. Анализируя денситометрические показатели, было установлено, что наиболее сильными продуцентами биопленок являются исследуемые Cd23, Cd27 и Cd3. Также они имеют промежуточный и резистентный балл к противогрибковым препаратам.

2.2.4. Определение способности *Malassezia pachydermatis* адгезироваться к клеткам буккального эпителия. Адгезия МР к эпителиальным клеткам является первым и обязательным этапом развития отита. При этом на реализацию адгезивного потенциала в системе «М - эпителиальные клетки» может влиять множество факторов, как со стороны ДПГ, так и со стороны организма хозяина. В связи с вышеизложенным модель искусственной колонизации МР на буккальных эпителиальных клетках является простым и удобным способом оценки адгезивного потенциала микроорганизма и позволяет оценить влияние различных факторов мукозального иммунитета на адгезивные реакции в системе «макроорганизм-микроорганизм». Проведенные исследования позволили установить масштаб различий штаммов МР в адгезивных взаимоотношениях с клетками буккального эпителия собак. Он оказался достаточно большим для культур от собак (средний ИП = $5,07 \pm 0,72$; $K = 51,41 \pm 5,39$) и менее выраженным для штаммов, выделенных от кошек (средний ИП = $3,26 \pm 0,51$; $K = 48,76 \pm 4,07$). Для дальнейших исследований был выбран штамм МР Cd23, который отличался высоким значением индекса адгезии $8,28 \pm 0,62$ и коэффициентом адгезии $70,62 \pm 4,91$.

2.2.5. Фагоцитоз *Malassezia pachydermatis* альвеолярными макрофагами крыс *in vitro*. Наиболее эффективный фагоцитоз осуществляют макрофаги, так как они обладают большим количеством эффективных антимикотических факторов, в отличие от нейтрофилов, которые первыми устремляются к месту заражения. Макрофаги способны к прямой адгезии МР. При этом наиболее активными и более дифференцированными являются альвеолярные макрофаги, что объясняет очень редкое повреждение легких при попадании М и их колонизации. Для оценки фагоцитоза была использована методика получения макрофагов из бронхоальвеолярной жидкости крыс, экспрессированной *in vitro*, как описано ранее. По данным исследований о биопленкообразовании, резистентности и адгезии наиболее агрессивными штаммами оказались МР Cd3, МР Cd23 и МР Cd27. Соответственно, было целесообразно провести сравнительный анализ показателей фагоцитоза на этих трех штаммах, так как технически сложно анализировать фагоцитарную активность на 35 изолятах из-за огромного объема работы. Полученные данные были проанализированы для этих трех штаммов и представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели фагоцитоза МР на модели альвеолярных макрофагов крыс

Изолят	Время инкубации	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число	Индекс переваривающей способности, %
МР Cd3	60 минут	$81,0 \pm 2,0$	$7,2 \pm 1,1$	18,1
	150 минут	$46,0 \pm 1,9$	$5,9 \pm 1,2$	
МР Cd23	60 минут	$88,7 \pm 2,8$	$8,6 \pm 1,0$	- 9,3
	150 минут	$83,1 \pm 2,7$	$9,4 \pm 1,1$	
МР Cd27	60 минут	$76,0 \pm 3,1$	$7,8 \pm 1,1$	26,9
	150 минут	$51,0 \pm 2,4$	$5,7 \pm 1,2$	

На основании анализа таблицы 3 важно отметить следующее, что через час инкубации показатели ФИ и ФЧ трех микроорганизмов достоверно не различались. Однако при последующей инкубации (150 минут) ФИ и ФЧ МР Cd23 были существенно выше, чем у двух других, и составили $83,1 \pm 2,7\%$ и $9,4 \pm 1,1$ соответственно. Причем при сравнении ФИ и ФЧ трех штаммов в разное время можно прийти к выводу, что к концу опыта макрофаги переварили основную часть микроорганизмов МР Cd3 и МР Cd27, тогда как у МР Cd23 фагоцитоз все еще находился на стадии захвата. Установлено, что показатели ИПС, которые более четко характеризуют устойчивость штамма к фагоцитозу, достоверно различимы у выделенных изолятов. Отрицательное значение этого показателя у МР Cd23 свидетельствует о том, что макрофаги не справились со своей задачей, а ДПГ смогли размножиться и долгое время сохранять жизнеспособность внутри макрофагов. Таким образом, МР Cd23 является значительно более устойчивым к фагоцитозу микроорганизмом.

2.2.6. Моделирование отита у кроликов штаммом *Malassezia pachydermatis* от собак. Модель отита включала однократное нанесение на скарифицированную кожу уха 1 мл МР Cd23 в концентрации 10^8 КОЕ/мл без какой-либо иммуносупрессии животных дополнительными препаратами. Клинические признаки, течения инфекции отображены в таблице 4.

Таблица 4. Выраженность различных клинических признаков модели малассезиозный отит кроликов в течении месяца наблюдений

Параметры	Контроль	Дни исследований					
		5	10	15	20	25	30
Потеря аппетита / массы	—	—	—	+	+	+	++
Эритема	—	+	++	++	+++	++++	++++
Зуд	—	—	+	++	+++	++++	++++
Сера	—	—	+	+	++	++++	++++
Неприятный запах	—	—	—	+	++	++++	++++

Примечание: — норма; + легкая форма; ++ умеренная; +++ тяжелая; ++++ очень тяжелая

У кроликов (n=5) каждые 5 дней брали мазки из ушей с последующей микроскопией и посевом на питательные среды. В мазках под микроскопом обнаруживали МР и подтверждали ростом на Сабуро агаре (таблица 5). Однако в последующем исследовании, при повторении экспериментального отита у кроликов, мы хотим более точно количественно оценить ВУ и то, как изменяется количество и состав других микроорганизмов в слуховом проходе.

Таблица 5 - Наличие *Malassezia pachydermatis* в ушном секрете подопытных кроликов

Параметры	Контроль	Дни исследований					
		5	10	15	20	25	30
Наличие ДПГ в мазках содержимого из ушей	—	+	+	+	++	++	+++
рост МР на питательных средах	—	+	++	++	+++	++++	++++

Примечание: — отсутствие; + единичные клетки/колонии; ++ небольшое количество; +++ большое количество; ++++ сплошной рост

У животных каждые 5 дней брали кровь из краевой ушной вены по две пробы от каждого для определения гематологических и биохимических показателей по общепринятым методам, а также активности факторов неспецифического иммунитета. Показатели крови до заражения служили в качестве контроля (таблица 6).

Анализ гематологических показателей продемонстрировал прогрессирующий лейкоцитоз с каждым измерением, что говорит о нарастающем воспалительном процессе в организме зараженных животных. Так, на 5-ый день опыта количество лейкоцитов было на 29,9 % выше, чем в контрольной группе, а на 30-ый день – уже на 62,4 %.

Лейкограмма показала, что при клинической манифестации экспериментального МО в крови кроликов регистрируется увеличение палочкоядерных в 3,15 раза и сегментоядерных в 1,38 раза нейтрофилов уже на 5 день исследования. Следует отметить, что к 30 дню течения патологии палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы были увеличены в 6,45 и 1,76 раза, соответственно, при сравнении с выходными данными. Кроме этого, регистрировали прогрессирующую лимфопению: на 5 день воспалительного процесса количество лимфоцитов в крови кроликов было снижено на 28,7 %, с $62,80 \pm 3,64$ % до $44,80 \pm 6,35$ %, а к 30 дню эксперимента – на 72,4 %, с $62,80 \pm 3,64$ % до $17,30 \pm 3,43$ %.

Таблица 6 - Гематологические показатели крови кроликов (n=10) в эксперименте

Параметры	ФП	Контроль	Дни исследований					
			5	10	15	20	25	30
Нб, г/л	100,00 – 160,00	$140,80 \pm 6,42$	$129,10 \pm 6,38^*$	$113,50 \pm 8,46^*$	$90,80 \pm 6,06^*$	$86,40 \pm 5,52^*$	$84,90 \pm 3,87^*$	$85,90 \pm 5,66^*$
СОЭ, мм/ч	1 – 3	$3,00 \pm 1,33$	$7,30 \pm 1,49^*$	$14,50 \pm 2,32^*$	$16,30 \pm 3,33^*$	$20,30 \pm 3,80^*$	$22,10 \pm 2,80^*$	$20,90 \pm 2,07^*$
Эритроциты, $10^{12}/л$	4,50 – 7,50	$5,62 \pm 0,65$	$5,25 \pm 0,61$	$4,70 \pm 0,44^*$	$4,18 \pm 0,40^*$	$3,74 \pm 0,37^*$	$3,50 \pm 0,20^*$	$3,44 \pm 0,21^*$
Лейкоциты, $10^9/л$	6,50 – 9,50	$6,96 \pm 0,30$	$9,93 \pm 0,85^*$	$12,23 \pm 0,72^*$	$13,90 \pm 1,00^*$	$15,96 \pm 1,44^*$	$16,54 \pm 1,70^*$	$18,51 \pm 1,13^*$
Пал. ядер.ней, %	5 – 9	$4,70 \pm 1,41$	$14,80 \pm 1,81^*$	$15,00 \pm 1,69^*$	$20,70 \pm 2,00^*$	$25,90 \pm 2,68^*$	$26,00 \pm 1,49^*$	$30,30 \pm 2,41^*$
Сег.ядер.ней, %	33 – 39	$25,00 \pm 2,00$	$34,60 \pm 2,11^*$	$37,00 \pm 1,76^*$	$41,10 \pm 2,02^*$	$40,90 \pm 1,96^*$	$43,00 \pm 3,23^*$	$44,00 \pm 2,53^*$
Эозинофилы, %	0 – 2	$0,50 \pm 0,70$	$0,40 \pm 0,51$	$0,60 \pm 0,69$	$0,70 \pm 0,48$	$0,90 \pm 0,56$	$0,80 \pm 0,63$	$0,80 \pm 0,63$
Моноциты, %	2 – 10	$4,80 \pm 1,22$	$4,90 \pm 1,19$	$5,00 \pm 1,15$	$5,10 \pm 1,19$	$5,30 \pm 1,41$	$5,20 \pm 0,78$	$4,70 \pm 0,94$
Базофилы, %	0 – 4	$2,20 \pm 0,91$	$2,30 \pm 0,82$	$2,40 \pm 0,84$	$2,80 \pm 0,78$	$3,20 \pm 1,03^*$	$3,30 \pm 0,94^*$	$2,90 \pm 1,10$
Лимфоциты, %	43 – 62	$62,80 \pm 3,64$	$44,80 \pm 6,35^*$	$40,00 \pm 2,44^*$	$29,60 \pm 3,50^*$	$23,80 \pm 3,19^*$	$21,50 \pm 3,53^*$	$17,30 \pm 3,43^*$
Тромбоциты, $10^9/л$	125,0 – 250,0	$223,30 \pm 16,39$	$204,80 \pm 17,68^*$	$208,00 \pm 14,99^*$	$203,10 \pm 10,94^*$	$197,20 \pm 14,31^*$	$180,60 \pm 11,89^*$	$182,50 \pm 12,21^*$
Гематокрит, %	35 – 45	$35,10 \pm 0,94$	$35,23 \pm 0,68$	$35,08 \pm 0,86$	$35,10 \pm 0,78$	$34,93 \pm 0,68$	$35,33 \pm 0,78$	$35,19 \pm 0,50$
МСН, Пг	17,5 – 23,5	$25,32 \pm 2,72$	$24,95 \pm 3,67$	$24,42 \pm 3,55$	$21,83 \pm 1,66^*$	$23,28 \pm 2,53$	$24,34 \pm 1,99$	$25,07 \pm 2,53$
МСНС, г/л	300,0 – 400,0	$401,27 \pm 18,65$	$366,50 \pm 18,60^*$	$323,53 \pm 23,32^*$	$258,79 \pm 18,55^*$	$247,31 \pm 14,88^*$	$240,36 \pm 11,96^*$	$244,09 \pm 15,64^*$
MCV, мкм ³	57,0 – 70,0	$63,12 \pm$	$67,81 \pm 8,38$	$75,25 \pm 7,92^*$	$84,76 \pm 9,30^*$	$94,25 \pm 10,34^*$	$101,50 \pm 6,34^*$	$102,91 \pm 6,25^*$

*Примечание: здесь и далее данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * - статистически значимая разница между опытом и контролем ($P < 0,05$); ФП – физиологический показатель.*

Установлено, что при экспериментальном течении отита в крови кроликов регистрируется тромбоцитопения в пределах физиологической нормы. Так, на 5 день исследования количество тромбоцитов снизилось в 1,09 раза, на 15 день – в 1,10, а к 30 дню – в 1,22 раза, при сравнении с данными до начала опыта. Так же в динамике воспалительного

процесса при отите у кроликов в крови наблюдали снижение средней концентрации гемоглобина в эритроците и увеличение среднего объема эритроцитов. На 5 день исследования показатель МСНС снизился на 8,66 %, а показатель MCV увеличился на 6,91 %, а к 30 дню исследования показатель МСНС уже был снижен на 39,17 %, а анализ MCV вырос на 38,66 %, при сравнении с данными контроля.

Изучение биохимических показателей сыворотки крови кроликов выявило достоверное увеличение концентрации липопротеинов высокой плотности, холестерина и триглицеридов после экспериментального заражения МР. Значение ЛПВП на 30-ый день опыта стал на 24,39% выше, чем в контрольной группе, уровень триглицеридов - на 8,41% выше, холестерина – на 8,06% выше, что может говорить о функциональной нагрузке на печень, и что сопоставляется с результатами исследования её ферментов. В то же время наблюдается снижение уровня сахара в крови и фибриногена плазмы на 12,75% и на 7,44% уже на 5-ый день после заражения по сравнению с контролем ($P < 0,05$) (таблица 7).

Таблица 7. Биохимические параметры крови кроликов в эксперименте

Параметры	ФП	Контроль	Дни исследования					
			5	10	15	20	25	30
Глюкоза, мг/дл	110,0 – 286,0	120,77 ± 4,81	105,38 ± 4,02*	103,00 ± 5,93*	108,32 ± 4,74*	106,88 ± 4,81*	105,61 ± 4,60*	104,02 ± 5,09*
Холестерин, мг/дл	35,0 – 120,0	118,36 ± 2,75	127,25 ± 3,81*	128,82 ± 4,01*	126,15 ± 4,78*	128,25 ± 3,27*	127,91 ± 5,03*	127,90 ± 4,62*
Триглицериды, мг/дл	122,5 – 157,5	138,62 ± 4,23	149,07 ± 3,90*	150,84 ± 3,52*	148,11 ± 3,46*	147,90 ± 4,32*	151,87 ± 4,73*	150,28 ± 4,92*
Мочевая кислота, мг/дл	1,5 – 2,0	1,73 ± 0,39	1,96 ± 0,35	2,01 ± 0,40	1,98 ± 0,37	2,00 ± 0,42	1,87 ± 0,55	1,93 ± 0,50
Мочевина, мг/дл	14,0 – 40,0	30,90 ± 4,13	33,61 ± 5,17	32,74 ± 5,91	33,00 ± 4,47	34,58 ± 4,90	33,04 ± 5,88	34,23 ± 4,65
Креатинин, мг/дл	0,5 – 1,6	0,75 ± 0,14	0,80 ± 0,13	0,82 ± 0,15	0,81 ± 0,12	0,86 ± 0,14	1,00 ± 0,23	0,95 ± 0,20
Кальций, мг/дл	9,6 – 16,8	9,45 ± 1,80	10,63 ± 1,44	10,26 ± 1,82	11,03 ± 2,05	10,43 ± 1,91	10,52 ± 1,04	10,37 ± 1,68
Альбумин, г/дл	2,7 – 4,6	5,44 ± 0,83	4,36 ± 1,25	5,03 ± 1,74	4,93 ± 1,62	5,06 ± 1,24	4,99 ± 2,23	4,81 ± 1,76
Общий белок, г/дл	5,4 – 7,5	7,60 ± 1,33	8,42 ± 1,28	6,90 ± 2,04	8,36 ± 1,31	8,53 ± 1,83	7,52 ± 1,75	8,04 ± 1,80
Липопротеины высокой плотности (ЛПВП), ммоль/дл	32,0 - 56,0	40,26 ± 3,05	49,10 ± 2,97*	45,83 ± 2,25	46,03 ± 2,40	49,13 ± 2,20*	47,99 ± 1,94*	50,08 ± 1,96*
Липопротеины низкой плотности (ЛПНП), ммоль/дл	13,2 – 25,2	14,10 ± 1,12	15,17 ± 1,48	16,32 ± 2,01	15,66 ± 1,29	16,03 ± 1,41	16,82 ± 1,27	17,02 ± 2,04
Фибриноген плазмы, мг/л	500,0 – 1500,0	610,1 ± 33,7	564,7 ± 25,7	460,2 ± 23,7*	464,8 ± 28,1*	430,7 ± 19,7*	434,1 ± 25,6*	404,8 ± 21,5*
Сывороточные глобулины, г/дл	2,0 – 4,0	2,36 ± 0,43	2,80 ± 0,82	2,74 ± 0,51	2,68 ± 0,63	2,63 ± 0,39	2,70 ± 0,48	2,51 ± 0,36

Такие показатели, как липопротеины низкой плотности, мочевины, мочевого кислоты, креатин, кальций, сывороточный глобулин, альбумин и общий белок, статистически значимых изменений не претерпели. Исследования функции печени показали, что практически все параметры выросли у кроликов после экспериментального заражения МР ($P < 0,05$) (таблица 8).

При этом следует отметить значительный скачок показателей уже на 5-ый день эксперимента, что может говорить о повышенной нагрузке на печень и ответу на воспалительный процесс у зараженных кроликов. Так, например, значение АЛТ увеличилось на 8,37%, АСТ – на 34,67, ЩФ – 15,78%, а ЛДГ – на 21,28%. В течение следующих опытных день наблюдается тенденция к увеличению концентрации печеночных ферментов, не столь прогрессирующем, как в первые 5 дней. На 30-ый день значение АЛТ было на 16,06% выше контроля, АСТ – на 32,63%, ЩФ – на 20,41%.

Таблица 8. Функциональные ферменты печени кроликов в эксперименте (n=10)

Параметры	ФП	Контроль	Дни исследований					
			5	10	15	20	25	30
Аланинаминотрансфераза (АЛТ) у годовалых кроликов, МЕ/л	47,4 – 120,0	113,56 ± 5,80	123,07 ± 6,18	121,38 ± 5,82	129,37 ± 4,99*	130,05 ± 6,16*	127,83 ± 5,84*	131,86 ± 6,01*
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	57,0 - 254,0	199,05 ± 12,86	230,46 ± 15,05*	228,71 ± 9,42*	231,88 ± 10,92*	226,76 ± 11,51*	235,04 ± 10,83*	239,67 ± 9,59*
Билирубин, мг/дл	0,4 - 1,2	0,50 ± 0,04	0,59 ± 0,03*	0,60 ± 0,05*	0,58 ± 0,03*	0,58 ± 0,03*	0,61 ± 0,04*	0,59 ± 0,03*
Аспартатаминотрансфераза (АСТ), МЕ/л	30,0 - 98,0	95,00 ± 10,60	127,94 ± 8,30*	131,17 ± 14,65*	129,36 ± 12,58*	128,53 ± 9,58*	130,04 ± 11,74*	126,00 ± 10,31*
Лактатдегидрогеназа, МЕ/л	135, 0 - 425,0	420,20 ± 36,51	509,63 ± 48,50	495,10 ± 38,50	510,93 ± 41,32*	519,40 ± 38,65*	512,94 ± 39,66*	515,70 ± 42,23*

2.2.7. Добавление в схему лечения кроликов с малассезиозным отом Фарнезола и исследование его влияния на различные показатели. Клиническое исследование крови является одним из важнейших методов диагностики, отображающим реакцию кроветворных органов на воздействие различных физиологических и патологических факторов, а также позволяет контролировать эффективность терапии. 35 кроликов были разделены на 7 групп по 5 животных. Каждая группа получала один из следующих препаратов:

1) Суrolан, действующими веществами которого являются: миконазол, полимиксин В, преднизолон;

2) Лосьон для чистки ушей Отифри с календулой, в состав которого входят такие компоненты, как: вода, пропиленгликоль, эмульгатор (Кремофор), календула;

3) Отоксолан содержит в качестве действующих веществ: марбофлоксацин, клотримазол, дексаметазон; и в качестве вспомогательных компонентов пропиленгаллат, среднепочечные триглицериды, сорбитанолеат, безводный коллоидный оксид кремния;

4) Суrolан + Фарнезол 200 мкМ/мл в равной пропорции;

5) Отифри + Фарнезол 200 мкМ/мл в равной пропорции;

6) Отоксолан + Фарнезол 200 мкМ/мл в равной пропорции;

7) Терапия Отипакс – контроль.

Все препараты наносили на всю пораженную поверхность уха. Обработку проводили один раз в день, продолжительность лечения составила 30 дней. Каждые пять дней в течение месяца у животных контрольной и 6 опытных групп брали мазки содержимого ушей и регистрировали клинические признаки заболевания.

Установлено, что применение лекарственных препаратов в комплексе с Фарнезолом у животных опытной группы уменьшало признаки гиперемии, отека, зуда, количество экссудата уже на 5-7-е сутки лечения, а полное клиническое выздоровление животных наступало, в среднем, на 20-е сутки эксперимента. При применении у животных коммерческих лекарственных препаратов (Суrolан; Отифри; Отоксолан) в монорежиме, в

среднем, улучшение клинического состояния наступало на 25-е сутки, а окончательное выздоровление наступало лишь после полного курса лечения - 30 суток. Однако при применении препарата Отифри сохранялась клиническая манифестация отита на протяжении всего эксперимента. У животных контрольной группы также сохранялись клинические признаки заболевания на протяжении всего эксперимента. Их состояние в динамике исследования ухудшалось, что доказывает эффективность разработанной нами модели отита у кроликов. Анализируя полученные результаты, можно сказать, что все схемы лечения с добавлением Фарнезола оказались эффективными, за счет широкого спектра его действия в отношении микроорганизмов, наиболее часто вызывающих отит, а также противовоспалительного эффекта.

Стоит отметить, что в опытных группах не было ни одного случая наличия МР в мазках и на питательных средах после комбинированной терапии препаратами Суrolан/Отифри/Отоксолан в комбинации с Фарнезолом, уже на 20 день терапии. При этом в контрольной группе у всех животных наблюдали ДПГ при микроскопии мазков ушного экссудата и присутствовал рост на специальных питательных средах в высоких концентрациях в течение всего эксперимента. Важно отметить, что при добавлении к какому-либо препарату препарат Фарнезол микробиологическое очищение от МР наступало, в среднем, на 5-10 дней раньше. При этом лучший результат в этой серии экспериментов был при сочетании Отоксолан + Фарнезол, так как полная санация ушей от МР было зафиксирована у животных этой группы уже на 10 день терапии.

Клинические показатели крови кроликов с отитом до лечения характеризовались низкими значениями количества эритроцитов - $5,20 \pm 0,34 \cdot 10^6/\text{мкл}$ и гемоглобина - $9,18 \pm 1,07$ г/дл. Наглядно показано, что на 5-10-й дни эксперимента статистически значимых различий между опытными группами и контрольной группой не наблюдали. На 15-й день нашего эксперимента статистически значимые различия между опытной и контрольной группой видны в уровне тромбоцитов у кроликов, получавших ежедневную терапию препаратами Отоксолан + Фарнезол. На 20-й различия видны в количестве тромбоцитов и средней концентрации корпускулярного гемоглобина у кроликов, получавших ежедневную терапию комбинациями препаратов Отоксолан + Фар; Суrolан + Фар; Отифри + Фар. На 25-й день различия регистрировали в количестве тромбоцитов; средней концентрации корпускулярного гемоглобина и общем количестве лейкоцитов у кроликов, получавших ежедневную терапию Отоксолан + Фар; Суrolан + Фар; Отифри + Фар и Отоксолан в монорежиме. На 30-й день нашего эксперимента статистически значимые различия зафиксированы в уровне тромбоцитов, который был на 16,62-14,57% ниже в опытных группах, получавших лечение, при сравнении с группой контроля. Также значительная разница была заметна при измерении общего количества лейкоцитов. Причем, наибольшее их снижение (на 36,36-39,25%) наблюдали в группах, получавших Фарнезол. Количество эритроцитов во всех опытных группах варьировало в значениях, близких к контролю, однако при этом значительные изменения наблюдали в значениях гематокрита, который увеличился на 27,42% в группе, получавшей терапию Суrolан, на 21,89% - Отифри, на 24,25% - Отоксолан, на 27,64% - Суrolан + Фар, на 25,96% - Отифри + Фар, на 21,21% - Отоксолан + Фарнезол, при сравнении с контрольной группой.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови кроликов в эксперименте с использованием различных схем лечения продемонстрировал, что в первые 10 дней эксперимента статистических различий в биохимических анализах нет. Это означает, что биохимическое равновесие, даже при адекватном лечении, в макроорганизме возникает не сразу. На 15-й, 20 и 25-й день эксперимента с использованием разных препаратов мы видим статистически значимые различия между показателями фибриногена плазмы и ЛПНП, при сравнении с контролем. К 30-м суткам эксперимента некоторые биохимические показатели вернулись к нормальным значениям до экспериментального заражения, особенно в группах животных с добавлением Фарнезола. Так, липопротеины высокой плотности на 30-ый день лечения в группах Суrolан + Фар, Отифри + Фар и Отоксолан + Фар был всего лишь на 13,11%, 16,34% и 13,34 % ниже, соответственно, чем в группе контроля. Фибриноген плазмы

в этих же опытных группах был на 12,39 %, 14,22 % и на 15,98 % выше, чем у контрольных животных. Помимо этого на 25-30-й день эксперимента анализ образцов печени показал, что такие показатели, как аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, аспартатаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа у кроликов, получавших местное лечение, отличались от показателей в контрольной группе без лечения ($P < 0,05$). Билирубин на протяжении всего экспериментального заражения МР был примерно одинаковым во все сроки и статистически не различался в разных группах. Нормализация четырех из пяти показателей вновь наблюдалась более быстро в группах, где добавляли Фарнезол в схему лечения.

2.2.8. Ингибирование биопленки *Malassezia pachydermatis* Фарнезолом. Среднее снижение измерялось и использовалось для расчета процента ингибирования биопленки Фарнезолом, где ОП AS — средняя оптическая плотность трех изолятов (МР С23,27 и 3) в эксперименте, OD AC — средняя оптическая плотность трех изолятов (МР С23,27 и 3) в контроле без Фарнезола (табл. 9).

Таблица 9. Влияние различных концентраций Фарнезола на биопленки МР и снижение средней оптической плотности, % денситометрические исследования

Концент- я фар Изолят	1 Контр оль без фарне- зола	2 200 μM	3 100 μM	4 50 μM	5 25 μM	6 12.5 μM	7 6.3 μM	8 3.1 μM	9 1.6 μM	10 0.8 μM	11 0.4 μM	12 0.2 μM
МР Cd23	0,441 ± 0,016	0,120 ±0,00 8	0,135 ±0,01 1	0,234 ±0,01 1	0,226 ±0,01 9	0,233 ±0,01 0	0,249 ±0,01 4	0,302 ±0,01 5	0,368 ±0,01 7	0,407 ±0,01 6	0,439 ±0,01 1	0,453 ±0,01 2
МР Cd27	0,403 ± 0,026	0,117 ±0,01 6	0,121 ±0,00 9	0,144 ±0,01 3	0,186 ±0,01 8	0,272 ±0,01 6	0,284 ±0,01 1	0,307 ±0,00 8	0,320 ±0,01 4	0,379 ±0,01 2	0,393 ±0,01 0	0,399 ±0,01 0
МР Cd3	0,400 ± 0,012	0,123 ±0,01 8	0,142 ±0,01 4	0,160 ±0,02 1	0,154 ±0,01 7	0,185 ±0,00 9	0,234 ±0,01 4	0,252 ±0,01 2	0,262 ±0,00 9	0,279 ±0,01 0	0,383 ±0,01 4	0,398 ±0,00 8
Ср. ОП 3 изо- лятов	0,415	0,120	0,133	0,179	0,189	0,230	0,256	0,287	0,317	0,390	0,405	0,417
Ср. сниж ение ОП, %	0	71	68	57	54	55	38	31	24	6	2,4	-0,5

Фарнезол продемонстрировал хорошие антибиопленочные эффекты при концентрации более 1,6 мкМ/мл (снижение ОП биопленки на 24%), а его самые высокие результаты (71-55%) наблюдались при концентрации 200-12,5 мкМ/мл.

2.2.9. Изменение чувствительности штамма МР к антимикотикам и влияние пяти концентраций Фарнезола на эти результаты. Тест на антибиотикорезистентность проводили со штаммом МР Cd23 стандартным диско-диффузионным методом на Сабуро агаре. Напомним, что данный штамм был устойчив к АР, КТ и FU. Умеренно устойчив к NS, CC, IT и VOR. И чувствителен только к MIC. Эксперименты с дисками проводили в трехкратной повторности. Данные в таблице по чувствительности к антимикробным препаратам приведены без +/- для лучшего понимания таблицы. +/- не превышали 0,4. Результаты исследований обрабатывали общепринятыми статистическими методами и считали достоверными при $p \leq 0,05$. Результаты эксперимента по изменению чувствительности МР к антимикробным препаратам при добавлении к последним Фарнезола представлены в таблице 10.

Из таблицы следует, что клинический штамм МР 23 оказался полностью устойчив к Амфотерицину В (АП). А с Фарнезолом даже в небольших концентрациях этот препарат начинал работать. Следует обратить внимание и на наличие результатов с некоторыми

препаратами, где Фарнезол мало влиял на чувствительность: например, с Клотримазолом. Последний все же «сдался» при добавлении Фарнезола в самой высокой концентрации 200 мкМ/мл. Есть и уникальные показатели: чувствительность МР к Нистатину, Вориконазолу и Кетоконазолу увеличивалась в два раза при добавлении Фарнезола в концентрации 25-200 мкМ/мл.

Таким образом, в большинстве случаев при добавлении Фарнезола в эксперименте регистрируется увеличение чувствительности микроорганизма к лечебным противогрибковым препаратам по сравнению с контролем.

Таблица 10 - Чувствительность штамма МР к антимикотикам и влияние концентраций Фарнезола на эти результаты

Название антимикотика	время	Только антимикотик	Антимикотик + ФР (контроль)	Антимикотик + 12.5 Фарнезол	Антимикотик + 25 Фарнезол	Антимикотик + 50 Фарнезол	Антимикотик + 100 Фарнезол	Антимикотик + 200 Фарнезол
NS	24ч	10	10	17 (+ 70.0 %)	20 (+ 100.0 %)	21 (+ 110.0 %)	21 (+ 110.0 %)	21 (+ 110.0 %)
	48ч	10	10	16 (+ 60.0 %)	16 (+ 60.0 %)	18 (+ 80.0 %)	18 (+ 80.0 %)	18 (+ 80.0 %)
AP	24ч	0	0	8	10	11	11	11
	48ч	0	0	6	10	11	11	11
KT	24ч	11	11	18 (+ 63.7 %)	19 (+ 72.7 %)	19 (+ 72.7 %)	20 (+ 81.8 %)	22 (+ 100.0 %)
	48ч	11	11	18 (+ 63.7 %)	18 (+ 63.7 %)	19 (+ 72.7 %)	20 (+ 81.8 %)	22 (+ 100.0 %)
CC	24ч	14	14	14	14	14	14	15 (+ 7.1 %)
	48ч	13	13	13	13	13	13	15 (+ 15.4 %)
VOR	24ч	11	11	18 (+ 63.7 %)	19 (+ 72.7 %)	19 (+ 72.7 %)	20 (+ 81.8 %)	22 (+ 100.0 %)
	48ч	11	11	18 (+ 63.7 %)	18 (+ 63.7 %)	19 (+ 72.7 %)	20 (+ 81.8 %)	22 (+ 100.0 %)
FU	24ч	8	8	8	10 (+ 25.0 %)	11 (+ 37.5 %)	11 (+ 37.5 %)	11 (+ 37.5 %)
	48ч	6	6	6	10 (+ 66.7 %)	11 (+ 83.3 %)	11 (+ 83.3 %)	11 (+ 83.3 %)
MIC	24ч	17	17	18 (+ 5.9 %)	19 (+ 11.8 %)	19 (+ 11.8 %)	20 (+ 17.6 %)	20 (+ 17.6 %)
	48ч	16	17	18 (+ 5.9 %)	18 (+ 5.9 %)	19 (+ 11.8 %)	20 (+ 17.6 %)	20 (+ 17.6 %)
IT	24ч	13	13	13	14 (+ 7.7 %)	14 (+ 7.7 %)	14 (+ 7.7 %)	15 (+ 15.4 %)
	48ч	13	13	13	13	14 (+ 7.7 %)	14 (+ 7.7 %)	15 (+ 15.4 %)

	- Фарнезол увеличивает зону подавления роста
	- Фарнезол не влияет на зону задержки роста

2.2.10. Эффективность применения Фарнезола для лечения отитов собак осложненных *Malassezia pachydermatis*. В исследовании было задействовано 30 собак с отитом, осложненным *Malassezia pachydermatis*. Животных разделили на 2 группы: опытную (n=15) и контрольную (n=15). Клинические показатели крови собак с *Malassezia*-отитом до лечения характеризовались невысокими значениями количества эритроцитов - $5,94 \pm 0,72 \cdot 10^{12}/л$, что нельзя назвать анемией, но является пограничным значением. Также у больных животных наблюдали снижение гемоглобина до $127,38 \pm 9,34$ г/л (табл. 11). Число лейкоцитов в крови у больных животных в пределах нормы $13,14 \pm 3,85 \cdot 10^9/л$, но после терапии количество лейкоцитов стало чуть ниже. После лечения количество гемоглобина в крови у собак увеличилось до значений $168,54 \pm 8,34$ г/л в опыте и $137,60 \pm 9,34$ г/л в контроле. Между этими

показателями есть достоверная разница в 1,2 раза, что указывает на положительное влияние Фарнезола при лечении *Malassezia*-отите. Небольшая эозинофилия (но в пределах нормы), которую можно наблюдать до лечения малацезиозного отита, характерна при многих инфекционных и инвазионных заболеваниях, а также при интоксикациях. Так же у собак до лечения наблюдалась увеличение палочкоядерных нейтрофилов $9,63 \pm 2,03$, что выше физиологической нормы и также свидетельствует о воспалительном процессе при небольших значениях сегментоядерных $56,28 \pm 5,26$. После двухнедельного лечения мы можем наблюдать улучшение клинических показателей крови собак и даже видим статистически достоверную разницу между опытом и контролем в отношении палочкоядерных нейтрофилов ($1,59 \pm 0,32$ в опыте и $2,25 \pm 0,34$ в контроле), эозинофилов ($5,86 \pm 1,72$ и $8,32 \pm 1,62$) и уровня гемоглобина ($168,54 \pm 8,14$ и $137,60 \pm 9,34$). Данный процесс мы характеризуем как выраженную воспалительную реакцию, проявляющуюся яркими клиническими признаками, а также клеточной динамикой, которая является важным критерием индикации заболевания.

Таблица 11. Клинические показатели крови собак в эксперименте

Показатели	ФП	До лечения (n=30)	После лечения	
			Опыт (n=15)	Контроль (n=15)
Эритроциты, $10^{12}/л$	5,5 - 8,5	$5,94 \pm 0,72$	$7,91 \pm 0,87$	$7,12 \pm 1,04$
Гематокрит, %	37 - 55	$38,12 \pm 3,98$	$51,54 \pm 3,86$	$46,02 \pm 4,37$
Гемоглобин, г/л	120 - 180	$127,38 \pm 9,34$	$168,54 \pm 8,14^*$	$137,60 \pm 9,34^*$
Лейкоциты, $10^9/л$	6 - 17	$13,14 \pm 3,85$	$8,54 \pm 1,98$	$11,14 \pm 2,61$
Пал. ядер. ней, %	0 - 3	$9,63 \pm 2,03$	$1,59 \pm 0,32^*$	$2,25 \pm 0,34^*$
Сег. ядер. ней, %	60 - 70	$56,28 \pm 5,26$	$61,20 \pm 5,45$	$58,82 \pm 5,25$
Эозинофилы, %	2-12	$10,41 \pm 3,16$	$5,86 \pm 1,72^*$	$8,32 \pm 1,62^*$
Моноциты, %	3 - 10	$4,27 \pm 0,84$	$2,69 \pm 0,35$	$3,13 \pm 0,64$
Базофилы, %	0 - 1	$0,06 \pm 0,02$	0	0
Лимфоциты, %	12 - 30	$22,41 \pm 3,34$	$28,66 \pm 2,24$	$27,48 \pm 2,57$

Таким образом, при добавлении Фарнезола в схему лечения отитов грибковой этиологии у собак регистрируются небольшие изменения клинического состава крови, характеризующиеся увеличением количества эритроцитов и гемоглобина, снижением числа лейкоцитов, при чём снижаются показатели эозинофилов и палочкоядерных нейтрофилов в опыте по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования

1. Установлено, что заболевание малоссеизиозный отит не зависит от возраста и породы животных. При анализе полученных данных о видовом разнообразии чаще всего *M. pachydermatis* как монокультура выявлялась у собак в 15%, у кошек – в 19% случаев, в ассоциации с 1 видом бактерий – в 9% у собак и в 14% у кошек; в ассоциации с 2 видами бактерий – в 6 и 14% соответственно; в ассоциации с 3 видами бактерий – в 6 и 13%; в ассоциации с 4 и более видами бактерий – в 16 и 6%; в ассоциации с 1 видом грибов – в 6 и 4%; в ассоциации с 1 видом грибов и 1 видом бактерий – в 8 и 15%; в ассоциации с 1 видом грибов и 2 видами бактерий – в 14 и 7%; в ассоциации с 1 видом грибов и 3 видами бактерий – в 11 и 5%; в ассоциации с 1 видом грибов и 4 и более видами бактерий – в 9 и 3%.

ассоциации МР у собак чаще всего были со стафилококками и стрептококками, а у кошек - с энтеробактериями и стафилококками.

2. Анализируя денситометрические показатели всех выделенных образцов (n=35), было установлено, что изоляты МР Cd23, Cd27 и Cd3 от собак являются наиболее сильными продуцентами биопленок. Профиль резистентности этих трех микроорганизмов выглядел следующим образом: штамм МР Cd23 был резистентен к 87,5% антимикотикам; Cd27 к 37,5%; Cd3 к 50%. Также статистически доказана связь между способностью образовывать биопленки и чувствительностью к лекарственным препаратам.

3. Штаммы МР способны адгезироваться на буккальных эпителиальных клетках собак. Адгезия была продуктивней для культур от собак и менее выраженной для штаммов, выделенных от кошек. У изолята МР Cd23 зафиксирован самый высокий индекс адгезии $8,28 \pm 0,62$ и коэффициент адгезии - $70,62 \pm 4,91$.

4. При проведении исследования на фагоцитоз отмечено, что фагоцитарное число и индекс МР Cd23 были существенно выше, чем у других штаммов, и составили $83,1 \pm 2,7\%$ и $9,4 \pm 1,1$ соответственно.

5. Малассезиозный отит эффективно воспроизводится *in vivo* на кроликах с яркими клинические признаки заболевания. Биохимические исследования сыворотки крови экспериментальных животных показали увеличение ферментов печени уже на 5-ый день исследования: Значение АЛТ увеличилось на 8,37%, АСТ – на 34,67%. При оценке результатов гематологического исследования можно отметить наличие воспалительного процесса в организме зараженных кроликов. Так, на 5-ый день опыта количество лейкоцитов было на 4,67% выше, чем в контрольной группе, а на 30-ый день – уже на 32,27%.

6. Применение лекарственных препаратов (Суrolан; Отифри; Отоксолан) + Фарнезол у животных опытной группы уменьшало признаки гиперемии, отека, зуда, количество экссудата на 5-7-е сутки лечения, а полное клиническое выздоровление животных наступало на 20-е сутки. При применении только лекарственных препаратов у животных в среднем улучшение клинического состояния наступало на 25-е сутки, а окончательное выздоровление наступало после полного курса лечения - 30 суток, а затем при применении Отифри один раз в сутки сохранялась краснота ушей. У животных контрольной группы на протяжении всего эксперимента сохранялись четкие клинические признаки заболевания. Их состояние ухудшалось и самостоятельно не восстанавливалось, что доказывает отличную эффективность разработанной нами модели МО у кроликов. Анализ показал, что микробиологические показатели, обеих схем лечения (с добавлением Фарнезола и без него) оказались эффективными, но схема, применяемая в опытной группе Фар + Суrolан/Отифри/Отоксолан, дала более быстрые результаты. При проведении терапевтических мероприятий в первые 10 дней эксперимента статистических различий в биохимических анализах крови кроликов нет, а к 30-м суткам эксперимента некоторые биохимические показатели вернулись к нормальным значениям до экспериментального заражения, особенно в группах животных с добавлением Фарнезола. Так, липопотеины высокой плотности на 30-ый день лечения в группах Суrolан + Фар, Отифри + Фар и Отоксолан + Фар были на 13,11%, 16,34% и 13,34% ниже, соответственно, чем в группе контроля. Аналогичные изменения наблюдаются и в результатах гематологического анализа.

7. Фарнезол продемонстрировал *in vitro* хорошие антибиопленочные эффекты при концентрации более 1,6 мкМ/мл (снижение ОП биопленки на 24%), а его самые высокие антибиопленочные эффекты (71-55% - более чем в два раза) наблюдались при концентрации 200-12,5 мкМ/мл.

8. Результаты эксперимента по изменению чувствительности МР к антимикробным препаратам показали, что Фарнезол повышает такую восприимчивость. Например, Амфотерицин В начал работать с Фарнезолом даже в малых концентрациях. Культура вновь стала чувствительной к Клотримазолу с Фар 200 мкМ/мл. Есть и уникальные показатели: чувствительность МР к Нистатину, Вориконазолу и Кетоконазолу увеличилась вдвое при добавлении Фарнезола в концентрации 25-200 мкМ/мл.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ:

1. Провести диагностику выделенных микроорганизмов из ушных раковин больных малассезиозом животных на предмет чувствительности к антибактериальным препаратам, поскольку в данном исследовании проверялась чувствительность только к противогрибковым средствам у основного возбудителя. Исследование сопутствующей флоры поможет подобрать оптимальную терапевтическую дозу Фарнезола.
2. Терапия малассезиозного отита должна включать местно Фарнезол в концентрации ≥ 200 мкМ/мл один раз в сутки в течении 10 дней. Необходимо разработать удобную аэрозольную форму лекарственного препарата, сочетающую в себе Фарнезол+антибиотик+антимикотик.
3. Провести клинические испытания терапии отитов Фарнезолом на собаках и кошках. Так же это исследование создаёт предпосылки для изучения Фарнезола в качестве основного лекарственного средства при других микозах различных животных.
4. Результаты могут быть использованы при проведении научных исследований, в учебном процессе при подготовке студентов по специальности «Ветеринария», повышении квалификации по диагностике и терапии животных с кожными патологиями, отитами, а также при составлении учебных и справочных пособий по ветеринарной медицине.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, В КОТОРЫХ ОПУБЛИКОВАНЫ ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ

Научные работы, опубликованные в рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень изданий, рекомендованных РУДН

1. **И.Р. Олабоде, Н.П. Сачивкина, Е.В. Киселёва, А.И. Щуров.** Эффективность применения Фарнезола для лечения отитов собак осложненных *Malassezia pachydermatis* / Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. – 2023. - 18(2). - с. 250—263. doi: 10.22363/2312-797X-2023-18-2-250-263
2. **И.Р. Олабоде, Н.П. Сачивкина, Е.В. Киселёва, В.И. Кузнецов, В.И. Семенова.** Корреляция между способностью образовывать биоплёнки и чувствительностью к антигрибковым препаратам у *Malassezia pachydermatis*/ Ветеринария, зоотехния и биотехнология 2023. № 6. С. 85–95; <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202306011>
3. **Olabode IR, Sachivkina NP, Smolentsev SY.** A study of blood parameters in rabbits with otitis caused by *Malassezia pachydermatis* and the effect of Farnesol on recovery rates when added to the treatment regimen. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. 2024;19(4):707—719. doi: 10.22363/2312-797X-2024-19-4-707-719

Научные работы, опубликованные в научных журналах, индексируемых в БД Web of Science и(или) Scopus

4. **Ifarajimi Rapheal Olabode, Nadezhda Sachivkina, Arfenia Karamyan, Ramziya Mannapova, Olga Kuznetsova, Anna Bobunova, Natallia Zhabo, Marina Avdonina and Regina Gurina.** In vitro activity of Farnesol against *Malassezia pachydermatis* isolates from otitis externa cases in dogs / Animals. – 2023. – 13. – p. 1259. <https://doi.org/10.3390/ani13071259>

Научные работы, опубликованные в региональных изданиях, материалах симпозиумов и конференций

5. **Олабоде И.Р.** Чувствительность к антимикотическим препаратам клинических штаммов *Malassezia pachydermatis*, полученных от собак с наружным отитом / Сборник тезисов VII Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVI КАШКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ) Проблемы медицинской микологии 2023. – 25(2). – с.153.

6. **Олабоде И.Р.** Study of resistance of clinical strains of *Malassezia pachydermatis* / Инновационные процессы в сельском хозяйстве: сборник статей XV Международной научно-практической конференции. Москва, 20–21 апреля 2023 г. / под ред. Э. А. Довлетяровой. – Москва: РУДН, 2023. – 400 с. – с. 169-173.

7. Виссарионова В.В., **Олабоде И.Р.**, Ватников Ю.А., с соавт. Морфологические показатели крови собак при лечении малассезиозного отита с использованием фарнезола / XXV Всероссийская студенческая научно-практическая конференция Нижневартковского государственного университета (г. Нижневартовск, 4-5 апреля 2023 г.) / Под общей ред. Д.А. Погonyшева. Ч. 1. Биология. Экология. География. Безопасность жизнедеятельности. Нижневартовск: изд-во НВГУ, 2023. 221 с. – с.42-48.

On the rights of the manuscript

Ifarajimi Rapheal Olabode

**MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND METHODS OF
TREATMENT OF OTITIS IN SMALL DOMESTIC ANIMALS**

Abstract

dissertations for the degree of candidate
of biological sciences

Specialty: 4.2.1. Animal pathology, morphology, physiology,
pharmacology and toxicology

Moscow 2025

The work was carried out in the Department of Veterinary Medicine of the Agrarian-Technological Institute of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN)

Scientific Director: **Sachivkina Nadezhda Pavlovna**, associate professor
Department of Veterinary Medicine, Peoples' Friendship
University of Russia, PhD in Biology, Associate Professor

Official opponents: **Pimenov Nikolay Vasilyevich**, Head of the Department of Immunology and Biotechnology of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Skryabin", Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Russian Academy of Sciences

Kontsevaya Svetlana Yuriyevna, Head of the Department of Agrobiotechnology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education "Russian Academy of Personnel Provision for the Agro-Industrial Complex", Doctor of Veterinary Sciences, Professor

Leading organization:

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Stavropol State Agrarian University"

The defense will take place on 11. 06. 2025 at 13:00 am at a meeting of the dissertation council PDS 2021.003 at the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, at the address: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya St., 8/2.

The dissertation can be found at the Educational and Scientific Information and Bibliographic Center of the Peoples' Friendship University of Russia at the following address: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya St., 6.

The abstract of the dissertation is posted on the
websites: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>, <https://www.rudn.ru/science/dissovet>

The dissertation abstract was sent out on April _____ 2025.

Scientific Secretary of the
Dissertation Council, Candidate of
Veterinary Sciences,
Associate Professor

Semenova Valentina Ivanovna

1. GENERAL CHARACTERISTICS OF THE WORK

Relevance of the topic. Otitis in small pets is a severe disease that reduces their quality of life, is a daily practice of veterinarians and a constant topic of conferences devoted to issues of surgical infection. In most cases, this pathology is caused by the yeast-like fungus *Malassezia pachydermatis* (M. *pachydermatis*, MP) (Kiss G. et al. 1996; Bond R. et al. 2010). According to a number of authors, the incidence of malasseziosis (M) in dogs is increasing every year worldwide (Ershov P.P., 2008; Pustovit E.A., Pimenov N.V. et al., 2024; Crespo MJ et al. 2002; Hobi S. et al. 2022). The skin and its derivatives are primarily affected, and the nervous, endocrine, excretory and other systems of the body are secondarily involved in the pathological process. *Malassezia*, which is highly variable in its clinical manifestations, is often diagnosed under other diagnoses. Traditional methods of drug therapy for such animals are ineffective in achieving complete remission, so the search for new drugs that allow for effective therapy is especially important (Buommino E. et al. 2016; Bajwa J. et al. 2023). Despite the fact that modern antifungal therapy is quite effective against acute infection, treatment of chronic recurrent *Malassezia* otitis (MO) is not always effective (Brito EHS et al. 2007; Weiler CB et al. 2013; Theelen B. et al. 2017). Thus, when prescribing systemic antifungals, the cure rate in the acute phase of MO is usually 60-80% (Li W. et al. 2020); while relapses of the disease are observed within 6 months in 20-22% of dogs (Guillot J. et al., 1999; Ilahi A. et al., 2018). These disappointing prognoses are in most cases associated with the increasing resistance of pathogens to antifungal agents. In this regard, there is a need to search for alternative ways of etiotropic therapy to stop surgical infection and, as one of the striking manifestations, *Malassezia* otitis. A possible promising direction for such a search is the study of phytopreparations that affect yeast-like fungi (YLF) or their sensitivity to antifungals (Kudinova S.A., Lutsai V.I. et al. 2021).

Level of development. A number of researchers have studied *Malassezia* in animals (Manoyan M.G., Ershov P.P., et al. 2006; Aiensaard J. et al. 2019; Schlemmer KB et al. 2019; Sim JXF et al. 2019; Puigdemont A. et al. 2021; Vercelli C. et al. 2021; Angiolella L. et al. 2023; Scheler J. et al. 2024), who have studied its distribution, causes, pathogenesis and treatment regimens. In recent years, interest in the treatment of M. *pachydermatis* infections with natural herbal products has increased significantly due to growing resistance to antifungal drugs (Bismarck D. et al. 2020; Ebani VV and Mancianti F. 2020). According to Duarte, ER et al. 2002, a significant frequency of relapses of MO forces doctors to extend the treatment regimen or increase the dose of the antimycotic. According to Gupta, AK et al. 2000, prolonging the treatment period can only shift the likelihood of relapse of *Malassezia* in time, and increasing the dose of the drug leads to additional side effects. The problem of anti-relapse therapy is further complicated by the fact that with the widespread use of drugs from the azole group, M resistance to them can develop (Morris DO et al. 2004; Lyskova P. et al. 2007; Cordeiro B. et al. 2022). Therefore, the study of new antifungal drugs, improvement of therapeutic regimens and their effect on the virulence of the pathogens are relevant in veterinary medicine.

Purpose of the study: to evaluate the potentiating effect of the herbal preparation Farnesol in relation to modern antifungal agents in the complex treatment of acute *Malassezia* otitis media in an in vivo model.

To achieve the intended goal, we were given the following tasks:

6. To study the properties of *Malassezia pachydermatis* strains and associated bacterial flora from clinically ill dogs and cats with malassezia otitis;
7. To investigate the ability of Farnesol to disrupt M. *pachydermatis* biofilms in vitro and enhance the effect of antifungal agents;
8. To evaluate the efficacy of in vivo models with M. *pachydermatis* infection;
9. To determine the effect of Farnesol on the treatment of malasseziosis in rabbits
10. To prove the enhancing effect of Farnesol on antimicrobial agents in a model of malasseziosis.

Scientific novelty. For the first time, a correlation was proven between the resistance of

Malassezia pachydermatis strains to modern antifungal agents and the ability to form biofilms. For this purpose, the strongest biofilm producers (optical density above 0.4) and the most resistant strains to antifungal agents (resistance was observed to 7 of 8 drugs) were selected. An analysis of the species diversity of microorganisms in malassezia otitis was carried out: in dogs, *M. pachydermatis* was more often isolated with staphylococci and streptococci, and in cats - with enterobacteria and staphylococci. For the first time, the maximum values of the adhesion index of *M. pachydermatis* (8.28 ± 0.62) and the adhesion coefficient ($70.62 \pm 4.91\%$) to the buccal epithelium of dogs were established. For the first time, the maximum values of the phagocytic index of *M. pachydermatis* ($83.1 \pm 2.7\%$) and phagocytic number (9.4 ± 1.1) to alveolar macrophages in rats were established. An original model of acute *Malassezia* otitis in rabbits was proposed. The therapeutic and anti-relapse effect of Farnesol was proven in in vivo experiments. Effective concentrations of Farnesol (12.5-200 $\mu\text{M/ml}$) were determined, leading to a 55-71% decrease in *M. pachydermatis* biofilms. It was proven that Farnesol in a dose of 25-200 $\mu\text{M/ml}$ enhances the effect of antimycotics (Amphotericin B, Nystatin, Voriconazole and Ketoconazole) or reactivates a drug that has ceased to act on the pathogen (Clotrimazole). It was found that adding Farnesol to the treatment regimen for fungal otitis in dogs resulted in a decrease in hyperemia, itching, edema, and purulent exudate on days 5-7 of treatment, and complete clinical recovery of animals occurred by day 10-14 of therapy. At the same time, an increase in hemoglobin by 1.22 times, a decrease in the number of leukocytes by 1.30 times were recorded, against the background of a decrease in eosinophils by 1.42 times and band neutrophils by 1.41 times, in the experimental group after treatment, when compared with the control.

Theoretical and practical significance of the work. An effective technology for modeling *M. pachydermatis* in laboratory animals has been developed. The proposed treatment regimen for *Malassezia* otitis allows for visible clinical improvement exceeding the healing rate of modern veterinary drugs. The natural drug Farnesol can be both the primary and additional therapeutic agent for the treatment of *Malassezia* otitis in dogs and cats and the prevention of its relapses. Inclusion of Farnesol in the treatment regimen can be considered as an alternative to the use of antimycotics in the event of resistance to them. During the work, a working collection of *M. pachydermatis* strains was collected, which will be used in further research by the Department of Veterinary Medicine to study antagonistic relationships between microorganisms of different species.

Methodology and research methods. The topic of the dissertation is part of the research work of the Department of Veterinary Medicine of the Agrarian and Technological Institute of RUDN. In conducting the research, methods of patent search, analysis, comparison, generalization, manipulations during therapy and statistical analysis were used. Research methods are clinical, biochemical, microbiological, morphological and statistical analysis of experimental data.

The main provisions submitted for defense:

1. The most aggressive clinical strain of *M. pachydermatis* Cd23 was selected for its ability to form biofilms, resistance to antifungal drugs, ability to adhere to epithelial cells and be phagocytosed by macrophages.
2. *Malassezia* otitis is reproduced in a laboratory rabbit model by infecting the auricle with an aggressive strain of yeast-like fungi without prior treatment with antibiotics and estradiol.
3. A laboratory model of *Malassezia* otitis demonstrated the therapeutic effect of Farnesol in combination with modern antifungal drugs, which resulted in rapid ear sanitation within a month and restoration of the rabbits' blood counts to normal.
4. The therapeutic effect of Farnesol is established due to the partial death of the population of yeast-like fungi as a result of their lysis and a decrease in the ability to form biofilms.
5. Farnesol has been shown to enhance the action of antifungal agents, which may serve as an alternative to the search for new drugs.

Degree of reliability and validation of research results. The reliability of the results of the conducted research, the validity of the main provisions of the work, conclusions and proposals are substantiated by a sufficient number of animals in the experimental groups, the study of domestic and foreign literature on the topic of the research, clinical, microbiological, morphological, biochemical data were obtained using modern methods on certified equipment

with subsequent statistical processing and analysis of the results obtained, research reports. The dissertation materials were presented and discussed at meetings and reporting sessions of the Academic Council of the Department of Veterinary Medicine of ATI RUDN (2021-2023), XV International Scientific and Practical Conference of Young Scientists "Innovative Processes in Agriculture" of RUDN (April 2023); XXV All-Russian Student Scientific and Practical Conference of Nizhnevartovsk State University, Nizhnevartovsk (April 2023); International Scientific Student Conference (ISSC-2023), Novosibirsk (April 2023). VII All-Russian Congress on Medical Microbiology, Clinical Mycology and Immunology - XXVI Kashkin Readings in St. Petersburg (June 2023).

Publications. The main provisions of the dissertation are presented in 7 scientific papers, 2 of which are in peer-reviewed publications recommended by the Higher Attestation Commission list, and 2 are in journals indexed in the Web of Science and Scopus databases.

Structure and scope of the dissertation. The main content of the work is presented on 125 pages, the manuscript consists of an introduction, a literature review, the main content of the work, including materials and methods, the results of own research, analysis and discussion of the research results, as well as a conclusion and a list of references. The list of references includes 157 titles. The work is illustrated with 34 tables and 24 figures.

2.MAIN CONTENT OF THE WORK

2.1. Materials and methods. The studies were conducted at the Department of Veterinary Medicine of the Agrarian and Technological Institute of the Peoples' Friendship University of Russia during 2021-2024. In vivo experiments and selection of biomaterial were carried out in accordance with International Bioethical Standards, the provisions of the IV European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123, 1986), and legislative acts of the Russian Federation on conducting experimental work. For our work (Figure 1), we used clinically obtained yeast-like fungi. For this, 76 cases of otitis externa in dogs and 10 cases of otitis in cats were examined in Moscow clinics, of which otitis with the etiology of *Malassezia pachydermatis* was confirmed in 30 cases in dogs and 5 cases in cats. Clinical forms of otitis in dogs and cats have been established: erythematous otitis, erythematous-ceruminous, ceruminous otitis and its proliferative form.

Preliminary identification of surgical infection strains, down to the genus level, was performed based on morphological and cultural properties. Final identification was performed using the Bruker Daltonik MALDI Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization technology. The following nutrient media were used in the study of the quantitative and qualitative microbial composition: for fungi - liquid and solid Sabouraud media (BioMerieux, France) with the addition of glucose, penicillin and streptomycin 100 IU/l; Sabouraud Chloramphenicol 2 agar (BioMerieux, France); Brain Heart Broth (HiMedia, India); Sabouraud Dextrose Agar Eur. Pharm. (Conda, Spain); Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, India); for other microorganisms - Endo, MPA, MPB, Ressel, Blaurock nutrient medium, MRS, bismuth sulfite agar, yolk-salt agar, etc. (HiMedia, India and Obolensk, Russia) (Rudenko P.A. et al. 2021). Densitometric parameters of microbial biofilms were studied using the patented method of Lenchenko E.M. et al. 2024. To determine the sensitivity of MP to antifungal drugs, the Kirby-Bauer disk diffusion method was used (Honnavar P. et al., 2016; Puigdemont A. et al., 2021). All strains isolated from animals with external otitis were classified as susceptible (S) - 1 point, intermediate (I) - 2 points; or resistant (R) – 3 points according to the manufacturer's control points for DPG. These points were entered into the table and calculated as the Degree of Resistance (Dr) to antifungal drugs (resulting sign) for statistical analysis of the chi-square criterion. Adhesive properties of MR to epithelial cells and determination of the ability of fungi to phagocytosis were determined using the methods described by Sachivkina N.P. in 2010. For the first experiment, buccal epithelial cells (BE) of a healthy dog were used.

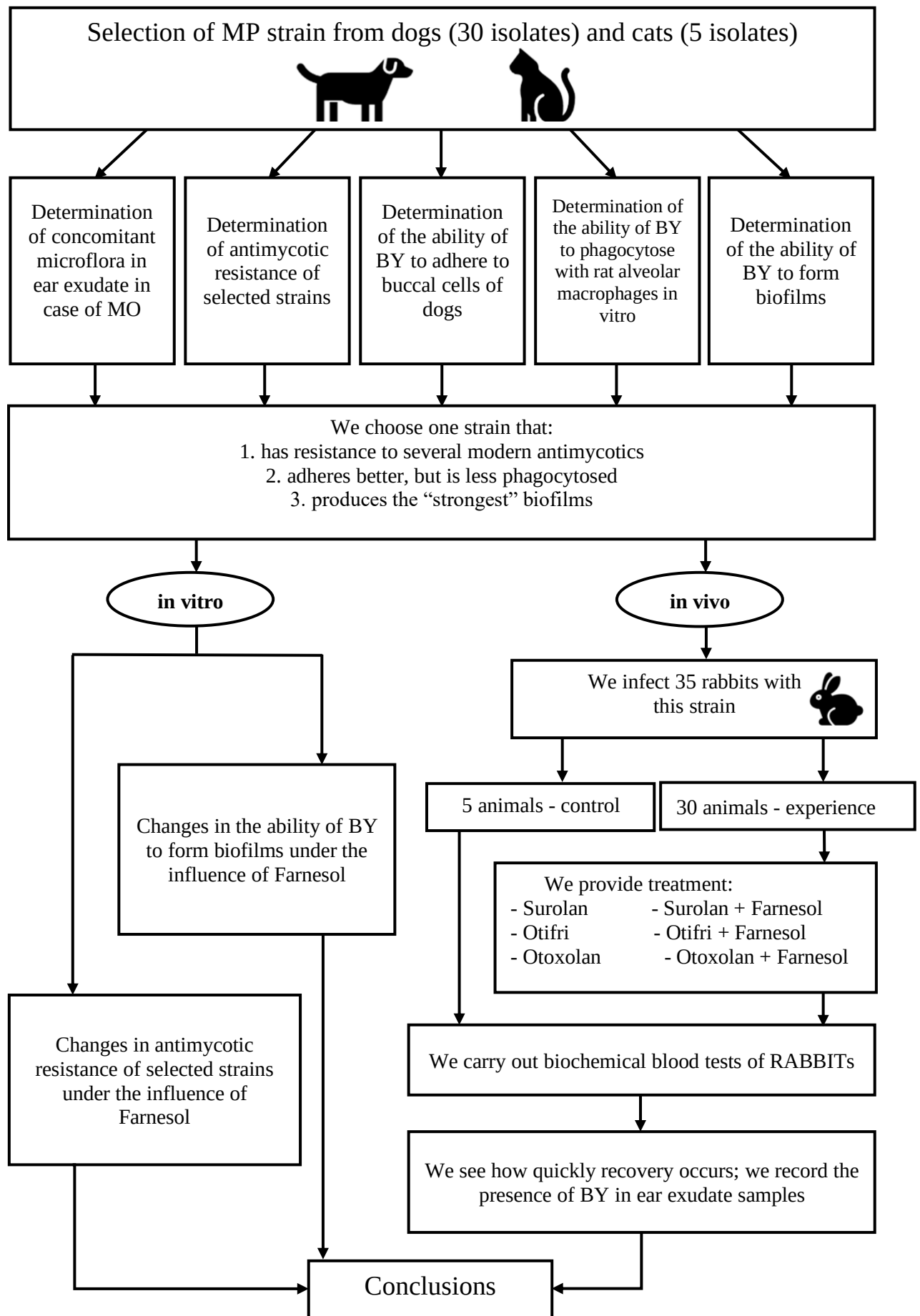


Fig. 1. Research plan.

The following parameters were determined: K - % BE with adhered MR; Adhesion index (AI) - the number of DPG on one BE relative to the number of active epithelial cells (an indicator characterizing the adhesiveness of the MR). For the second experiment, alveolar macrophages (AM) of rats were used. For the experiment, 20 white rats of both sexes, weighing 120-160 g, were used. The following indicators were determined: phagocytic number (NC), phagocytic index (PI) and digestive capacity index (DCI). The experiments were repeated three times.

The experiment involved 35 adult male Soviet Chinchilla rabbits, 1 year old and weighing 5.5 kg. A suspension of 1.5×10^8 cells/ml of MP was prepared for infection. The inner surface of the ear was scarified with a sterile blade and 1 ml of the microorganism suspension was applied to these scratches. The following clinical signs were recorded in the animals: abundant secretion of yellow-brown earwax (cerumen), often with an unpleasant odor, of varying severity: from mild to very severe; erythema; itching; change in skin color; diarrhea; weight loss; tremor. Blood and serum analysis was performed on a hematological analyzer (Chem Analyzer, Spain) using a diagnostic kit (BioMed Diagnostics, Germany).

The onset of complete recovery in rabbits and monitoring of relapses of *Malassezia* infection were confirmed by a bacteriological method. Ear exudate was applied to the surface of Sabouraud's nutrient medium and cultured at 37°C for 48-72 hours. The results were recorded by the presence (CFU count) or absence of growth. The effect of different Farnesol concentrations on MR biofilms was studied in vitro in plates by changing the biofilm density (Sachivkina N.P. et al. 2020).

The clinical study involved 30 dogs of different breeds, sexes and ages from 1 to 10 years. The animals were divided into 2 groups: experimental (n=15) and control (n=15). The experimental group was prescribed Surolan veterinary ear drops manufactured by Elanco Animal Health (Indiana, USA). Form - suspension, active ingredient - polymyxin B, prednisolone, miconazole, 2 times a day, for 14 days. Plus a solution of Farnesol (Far) (Sigma-Adrich, USA), which was prepared in advance at a farnesol concentration of 100 µM per ml, dilution was carried out in sterile physiological solution (SS) pH 7.0. After using Surolan drops, Farnesol was applied as a spray also twice a day. The control group was a group of animals that were prescribed only Surolan.

Statistically, all results were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of at least three replicates. The chi-square test was calculated in contingency tables, where the rows of the table correspond to optical density and the columns to microbial resistance. The data for these two criteria were pre-grouped into intervals.

Statistical significance was set at $p \leq 0.05$ and, where applicable, the difference between samples was assessed using XLSTAT 2020 statistical software (Addinsoft Inc., New York, USA). The effect of different Farnesol concentrations on the extent of biofilm formation was assessed using the log-logistic distribution. This model was chosen since the proportional hazards assumption of the Cox model did not fit all covariates. All graphs were generated using Microsoft Excel (Microsoft Excel for Office 365 MSO, Microsoft COP., Redmond, WA, USA).

2.2. Results of own research and their discussion

2.2.1. Study of the species composition of surgical infection and biological properties of microorganisms isolated from otitis in dogs and cats. A search was conducted for various forms of surgical infection in small domestic animals for the microbial landscape isolated from purulent exudate.

However, *Malassezia* fungi were isolated only from dogs and cats with purulent otitis. Therefore, the further choice of the direction of the study fell on the study of the pathogenetic features of the course of *Malassezia* otitis. MP strains were isolated from 30 dogs of different breeds, sexes and ages from 1 year to 14 years and 5 cats aged from 7 months to 10 years.

The composition of the accompanying microflora of ear exudate in malasseziosis of dogs and cats is presented in Table 1.

Table 1. Species composition of accompanying microflora ear exudate in malasseziosis in dogs and cats

Type of microorganism	Samples from dogs (n=30)		Samples from cats (n=5)	
	Abs. number	%	Abs. number	%
<i>S. saprophyticus</i>	3	3.7	3	4.7
<i>S. intermedius</i>	5	6.1	2	3.1
<i>S. epidermidis</i>	1	1,2	1	1.6
<i>S. aureus</i>	5	6.1	2	3.1
<i>S. hyicus</i>	3	3.7	3	4.7
<i>S. faecalis</i>	6	7.3	4	6.3
<i>S. uberis</i>	1	1,2	1	1.6
<i>E. coli</i>	11	13.4	8	12.5
<i>P. aeruginosa</i>	3	3.7	2	3.1
<i>P. vulgaris</i>	2	2.4	3	4.7
<i>K. oxytoca</i>	3	3.7	2	3.1
<i>B. subtilis</i>	2	2.4	2	3.1
<i>L. plantarum</i>	5	6.1	4	6.3
<i>L. rhamnosus</i>	5	6.1	5	5.3
<i>L. xylosus</i>	3	3.7	1	1,2
<i>L. acidophilus</i>	4	4.9	4	6.3
<i>B. adolescentis</i>	2	2.4	3	4.7
<i>B. animalis</i>	4	4.1	5	7.8
<i>B. bifidum</i>	7	8.5	6	9.4
<i>C. albicans</i>	4	4.9	2	3.1
<i>T. mentagrophytes</i>	2	2.4	1	1,2
<i>M. canis</i>	1	1,2	-	-
TOTAL	82	100	64	100

Comparing the microorganisms isolated from the external auditory canal of dogs due to MR infection, we found that M in monoculture were detected in 13.3% of dogs and 20.0% of cats, association with 1 bacterial species was found in 10.1% of dogs and 20.0% of cats; association with 2 bacterial species was found in 6.6% and 20.0%, respectively; association with 3 bacterial species was found in 6.6% and 0%; association with 4 or more bacterial species was found in 16.7% and 0%; association with 1 fungal species was found in 6.6% and 20.0%; association with 1 fungal species and 1 bacterial species was found in 6.6% and 0%; association with 1 fungal species and 2 bacterial species was found in 10.1% and 20.0%. association with 1 type of fungi and 3 types of bacteria - 10.1% and 0%; association with 1 type of fungi and 4 or more types of bacteria - 13.3% and 0%, respectively. It should be noted that associations of MP in dogs were most often with staphylococci and streptococci, and in cats MP was most often sown with enterobacteria and staphylococci.

2.2.3. Densitometric indices of *Malassezia pachydermatis* biofilms and their susceptibility to antimycotics. The densitometric indices of the sample are presented in Table 2. According to our gradation, 2 (6.7%) strains are weak biofilm producers, 25 (83.3%) strains are moderate producers and 3 (10%) are strong producers – isolates Cd23, Cd27 and Cd3.

Table 2. Determination of the intensity of biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* strains from dogs (Cd1 – Cd30), cats (Cc1 – Cc5) and their sensitivity to antifungals

Isolate	Optical density	Degree of OP	Antifungals								Degree of stability
			N.S.	AP	KT	CC	VOR	FU	MIC	IT	
MP Cd1	0.203 ± 0.016	2	1	1	3	1	1	2	1	1	11
MP Cd2	0.351 ± 0.018	2	1	2	1	2	2	3	1	1	13
MP Cd3	0.400 ± 0.012	3	1	1	1	2	2	3	2	1	13
MP Cd4	0.287 ± 0.018	2	1	3	1	2	1	1	1	3	13
MP Cd5	0.261 ± 0.011	2	2	1	1	2	2	1	1	1	11
MP Cd6	0.312 ± 0.029	2	1	1	1	1	1	3	1	1	10

MP Cd7	0.255 ± 0.010	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8
MP Cd8	0.243 ± 0.026	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cd9	0.190 ± 0.016	1	1	3	1	1	1	3	1	2	13
MP Cd10	0.237 ± 0.015	2	2	1	1	1	1	1	2	2	11
MP Cd11	0.345 ± 0.011	2	1	1	3	1	2	2	1	1	12
MP Cd12	0.323 ± 0.017	2	1	2	1	1	2	1	1	1	10
MP Cd13	0.192 ± 0.012	1	1	1	1	2	1	2	1	1	10
MP Cd14	0.258 ± 0.011	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cd15	0.261 ± 0.010	2	1	1	2	2	1	1	1	2	11
MP Cd16	0.313 ± 0.007	2	1	1	1	1	1	2	1	1	9
MP Cd17	0.294 ± 0.019	2	1	1	3	1	1	3	1	1	12
MP Cd18	0.286 ± 0.020	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cd19	0.362 ± 0.014	2	2	1	2	2	1	1	1	1	11
MP Cd20	0.366 ± 0.015	2	1	2	1	1	3	1	1	1	11
MP Cd21	0.280 ± 0.016	2	1	2	1	1	1	1	3	1	11
MP Cd22	0.344 ± 0.018	2	1	1	1	1	1	2	1	1	9
MP Cd23	0.441 ± 0.016	3	2	3	3	2	2	3	1	2	18
MP Cd24	0.370 ± 0.015	2	1	1	2	2	1	1	1	1	10
MP Cd25	0.323 ± 0.017	2	2	1	1	1	1	2	3	2	13
MP Cd26	0.288 ± 0.012	2	1	2	1	1	1	1	1	1	9
MP Cd27	0.403 ± 0.026	3	1	2	2	1	3	1	1	1	12
MP Cd28	0.368 ± 0.014	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8
MP Cd29	0.297 ± 0.011	2	1	1	1	1	3	2	1	1	11
MP Cd30	0.353 ± 0.019	2	1	1	2	1	1	3	3	1	13
MP Cc1	0.278 ± 0.011	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9
MP Cc2	0.211 ± 0.012	2	1	1	2	2	1	1	1	2	11
MP Cc3	0.219 ± 0.008	2	1	1	1	1	1	2	1	1	9
MP Cc4	0.280 ± 0.013	2	1	1	3	1	1	3	1	1	12
MP Cc5	0.226 ± 0.010	2	1	1	1	2	1	1	1	1	9

Note: OD control = 0.097 ± 0.005

Most MP strains were susceptible (S) to antifungals. However, several exceptions were noted: three strains were classified as resistant (R) to AP, MIC and VOR; four R to KT; seven R to FU and only one R to IT. No R results were found for the NS and CC antifungal discs. Intermediate results (I): 5 isolates to NS, KT and IT; 6 to AP and VOR; 12 to CC; 7 to FU; 2 to MIC. Strain MP Cd 23 was classified as R to AP, KT and FU, I to NS, CC, IT and VOR, S only to MIC. Strain MP Cd 27 was classified as R to VOR, I to AP, KT and S to others. Strain MP Cd 3 was classified as R to FU, I to CC, VOR and MIC. It has been statistically proven that there is a reliable relationship between the optical density of MR biofilms and their sensitivity to drugs. Analyzing densitometric indices, it was found that the strongest biofilm producers are the studied Cd23, Cd27 and Cd3. They also have an intermediate and resistant score to antifungal drugs.

2.2.4. Determination of the ability of *Malassezia pachydermatis* adhere to the cells of the buccal epithelium. Adhesion of MR to epithelial cells is the first and obligatory stage of MO development. At the same time, the implementation of adhesive potential in the "M - epithelial cells" system can be influenced by many factors, both from the DPG and from the host organism. In connection with the above, the model of artificial colonization of MR on buccal epithelial cells is a simple and convenient way to assess the adhesive potential of the microorganism and allows us to evaluate the influence of various factors of mucosal immunity on adhesive reactions in the "macroorganism-microorganism" system. The conducted studies allowed us to establish the scale of differences in MR strains in adhesive relationships with buccal epithelial cells of dogs. It was found to be quite large for cultures from dogs (mean IP = 5.07 ± 0.72; K = 51.41 ± 5.39) and less pronounced for strains isolated from cats (mean IP = 3.26 ± 0.51; K = 48.76 ± 4.07). Strain MP Cd23, which was distinguished by a high adhesion index of 8.28 ± 0.62 and an adhesion coefficient of 70.62 ± 4.91, was selected for further studies.

2.2.5. Phagocytosis of *Malassezia pachydermatis* by rat alveolar macrophages in vitro. The most effective phagocytosis is performed by macrophages, since they have a large number of

effective antifungal factors, unlike neutrophils, which are the first to rush to the site of infection. Macrophages are capable of direct adhesion of MP. In this case, the most active and more differentiated are alveolar macrophages, which explains the very rare lung damage when M enters and colonizes. To assess phagocytosis, a technique for obtaining macrophages from rat bronchoalveolar fluid expressed in vitro was used, as described earlier. According to the studies on biofilm formation, resistance and adhesion, the most aggressive strains were MP Cd3, MP Cd23 and MP Cd27. Accordingly, it was advisable to conduct a comparative analysis of phagocytosis indices on these three strains, since it is technically difficult to analyze phagocytic activity on 35 isolates due to the huge amount of work. The obtained data were analyzed for these three strains and are presented in Table 3.

Table 3. Parameters of phagocytosis of MR in the model of rat alveolar macrophages

Isolate	Incubation time	Phagocytic index, %	Phagocytic number	Digestive capacity index, %
MP Cd3	60 minutes	81.0 $\pm$ 2.0	7.2 $\pm$ 1.1	18.1
	150 minutes	46.0 $\pm$ 1.9	5.9 $\pm$ 1.2	
MP Cd23	60 minutes	88.7 $\pm$ 2.8	8.6 $\pm$ 0.0	- 9.3
	150 minutes	83.1 $\pm$ 2.7	9.4 $\pm$ 1.1	
MP Cd27	60 minutes	76.0 $\pm$ 3.1	7.8 $\pm$ 1.1	26.9
	150 minutes	51.0 $\pm$ 2.4	5.7 $\pm$ 1.2	

Based on the analysis of Table 3, it is important to note that after one hour of incubation, the FI and FF indices of the three microorganisms did not differ significantly. However, during subsequent incubation (150 minutes), the FI and FF of MP Cd23 were significantly higher than those of the other two and amounted to $83.1 \pm 2.7\%$ and 9.4 ± 1.1 , respectively. Moreover, when comparing the FI and FF of the three strains at different times, it can be concluded that by the end of the experiment, macrophages digested the bulk of the MP Cd3 and MP Cd27 microorganisms, while in MP Cd23 phagocytosis was still at the capture stage. It was found that the IPS indices, which more clearly characterize the resistance of the strain to phagocytosis, are reliably distinguishable in the isolated isolates. The negative value of this indicator in MP Cd23 indicates that the macrophages failed to cope with their task, and the DPG were able to reproduce and maintain viability inside the macrophages for a long time. Thus, MP Cd23 is a microorganism that is significantly more resistant to phagocytosis.

2.2.6. Modeling otitis in rabbits using *Malassezia pachydermatis* strain from dogs. The MO model included a single application of 1 ml of MP Cd23 at a concentration of 108 CFU/ml to the scarified skin of the ear without any immunosuppression of animals with additional drugs. Clinical signs and the course of infection are shown in Table 4.

Table 4. The severity of various clinical signs of the *Malassezia* otitis model in rabbits during a month of observations

Parameters	Control	Research Days					
		5	10	15	20	25	30
Loss of appetite/weight	-	-	-	+	+	+	++
Erythema	-	+	++	++	+++	++++	++++
Itching	-	-	+	++	+++	++++	++++
Sulfur	-	-	+	+	++	++++	++++
Unpleasant smell	-	-	-	+	++	++++	++++

Note:-normal; + mild; ++ moderate; +++ severe; ++++ very severe

Ear swabs were taken from rabbits (n=5) every 5 days for microscopic examination and culture on nutrient media. MR was detected in the swabs under the microscope and confirmed by

growth on Sabouraud agar (Table 5). However, in a subsequent study, when experimental otitis is repeated in rabbits, we want to more accurately quantify BY and how the number and composition of other microorganisms in the ear canal changes.

Table 5 -Availability*Malassezia pachydermatis* in ear secretion of laboratory rabbits

Parameters	Control	Research Days					
		5	10	15	20	25	30
Presence of DPG in smears of ear contents	-	+	+	+	++	++	+++
growth of MR on nutrient media	-	+	++	++	+++	++++	++++
Note: -absence; + single cells/colonies; ++ small quantity; +++ large quantity; ++++ continuous growth							

Blood was taken from the marginal ear vein of the animals every 5 days, two samples from each animal to determine hematological and biochemical parameters using generally accepted methods, as well as the activity of nonspecific immunity factors. Blood parameters before infection served as a control (Table 6).

Analysis of hematological parameters demonstrated progressive leukocytosis with each measurement, which indicates a growing inflammatory process in the body of infected animals. Thus, on the 5th day of the experiment, the number of leukocytes was 29.9% higher than in the control group, and on the 30th day - already 62.4%.

The leukogram showed that with the clinical manifestation of experimental MO, an increase in band neutrophils by 3.15 times and segmented neutrophils by 1.38 times was recorded in the blood of rabbits already on the 5th day of the study. It should be noted that by the 30th day of the pathology, band and segmented neutrophils were increased by 6.45 and 1.76 times, respectively, when compared with the output data. In addition, progressive lymphopenia was recorded: on the 5th day of the inflammatory process, the number of lymphocytes in the blood of rabbits was reduced by 28.7%, from $62.80 \pm 3.64\%$ to $44.80 \pm 6.35\%$, and by the 30th day of the experiment - by 72.4%, from $62.80 \pm 3.64\%$ to $17.30 \pm 3.43\%$.

Table 6 - Hematological parameters of rabbit blood (n=10) in the experiment

Parameters	FP	Control	Research Days					
			5	10	15	20	25	30
Hb, g/l	100.00 –160.00	140.80±6.42	129.10±6.38*	113.50±8.46*	90.80±6.06*	86.40±5.52*	84.90±3.87*	85.90±5.66*
ESR, mm/h	1 – 3	3.00±1.33	7.30±1.49*	14.50±2.32*	16.30±3.33*	20.30±3.80*	22.10±2.80*	20.90±2.07*
Erythrocytes, 10 ¹² /l	4.50 – 7.50	5.62±0.65	5.25±0.61	4.70±0.44*	4.18±0.40*	3.74±0.37*	3.50±0.20*	3.44±0.21*
Leukocytes, 10 ⁹ /l	6.50 – 9.50	6.96±0.30	9.93±0.85*	12.23±0.72*	13.90±1.00*	15.96±1.44*	16.54±1.70*	18.51±1.13*
P, %	5 – 9	4.70±1.41	14.80±1.81*	15.00±1.69*	20.70±2.00*	25.90±2.68*	26.00±1.49*	30.30±2.41*
WITH, %	33 – 39	25.00±2.00	34.60±2.11*	37.00±1.76*	41.10±2.02*	40.90±1.96*	43.00±3.23*	44.00±2.53*
Eh, %	0 – 2	0.50±0.70	0.40±0.51	0.60±0.69	0.70±0.48	0.90±0.56	0.80±0.63	0.80±0.63
M, %	2 –10	4.80±1.22	4.90±1.19	5.00±1.15	5.10±1.19	5.30±1.41	5.20±0.78	4.70±0.94
B, %	0 – 4	2.20±0.91	2.30±0.82	2.40±0.84	2.80±0.78	3.20±1.03*	3.30±0.94*	2.90±1.10

Lymphocytes, %	43 – 62	62.80±3.6 4	44.80±6.3 5*	40.00±2.4 44*	29.60±3.5 50*	23.80±3.19*	21.50±3.53*	17.30±3.43*
Platelets, 109/l	125.0 – 250.0	223.30±16.39	204.80±17*.68	208.00±14.99*	203.10±10.94*	197.20±14.31*	180.60±11.89*	182.50±12.21*
Hematocrit, %	35 – 45	35.10±0.9 4	35.23±0.6 8	35.08±0.86	35.10±0.78	34.93±0.68	35.33±0.78	35.19±0.50
MCH, Pg	17.5 – 23.5	25.32±2.7 2	24.95±3.6 7	24.42±3.55	21.83±1.66*	23.28±2.53	24.34±1.99	25.07±2.53
MCHC, g/l	300.0 – 400.0	401.27±18.65	366.50±18*.60	323.53±23.32*	258.79±18.55*	247.31±14.88*	240.36±11.96*	244.09±15.64*
MCV, µm ³	57.0 – 70.0	63.12±	67.81±8.3 8	75.25±7.92*	84.76±9.30*	94.25±10.34*	101.50±6.34*	102.91±6.25*
<i>Note: here and below, data are presented as mean ± SD. * - statistically significant difference between the experiment and the control (P<0.05); FP - physiological indicator.</i>								

It was found that thrombocytopenia within the physiological norm was recorded in the blood of rabbits during the experimental course of MO. Thus, on the 5th day of the study, the number of platelets decreased by 1.09 times, on the 15th day - by 1.10, and by the 30th day - by 1.22 times, when compared with the data before the experiment. Also, in the dynamics of the inflammatory process in MO in rabbits, a decrease in the average concentration of hemoglobin in the erythrocyte and an increase in the average volume of erythrocytes were observed in the blood. On the 5th day of the study, the MCHC indicator decreased by 8.66%, and the MCV indicator increased by 6.91%, and by the 30th day of the study, the MCHC indicator had already decreased by 39.17%, and the MCV analyte increased by 38.66%, when compared with the control data.

The study of biochemical parameters of blood serum of rabbits revealed a reliable increase in the concentration of high-density lipoproteins, cholesterol and triglycerides after experimental infection with MP. The value of HDL on the 30th day of the experiment became 24.39% higher than in the control group, the level of triglycerides - 8.41% higher, cholesterol - 8.06% higher, which may indicate a functional load on the liver, and which is compared with the results of the study of its enzymes. At the same time, a decrease in the level of sugar in the blood and plasma fibrinogen by 12.75% and by 7.44% is observed already on the 5th day after infection compared to the control (P < 0.05) (Table 7).

Table 7. Biochemical parameters of rabbit blood in the experiment

Parameters	FP	Control	Days of research					
			5	10	15	20	25	30
Glucose, mg/dl	110.0 – 286.0	120.77 ± 4.81	105.38 ± 4.02*	103.00 ± 5.93*	108.32 ± 4.74*	106.88 ± 4.81*	105.61 ± 4.60*	104.02 ± 5.09*
Cholesterol, mg/dl	35.0 – 120.0	118.36 ± 2.75	127.25 ± 3.81*	128.82 ± 4.01*	126.15 ± 4.78*	128.25 ± 3.27*	127.91 ± 5.03*	127.90 ± 4.62*
Triglycerides, mg/dL	122.5 – 157.5	138.62 ± 4.23	149.07 ± 3.90*	150.84 ± 3.52*	148.11 ± 3.46*	147.90 ± 4.32*	151.87 ± 4.73*	150.28 ± 4.92*
Uric acid, mg/dl	1.5 – 2.0	1.73 ± 0.39	1.96 ± 0.35	2.01 ± 0.40	1.98 ± 0.37	2.00 ± 0.42	1.87 ± 0.55	1.93 ± 0.50
Urea, mg/dl	14.0 – 40.0	30.90 ± 4.13	33.61 ± 5.17	32.74 ± 5.91	33.00 ± 4.47	34.58 ± 4.90	33.04 ± 5.88	34.23 ± 4.65
Creatinine, mg/dl	0.5 – 1.6	0.75 ± 0.14	0.80 ± 0.13	0.82 ± 0.15	0.81 ± 0.12	0.86 ± 0.14	1.00 ± 0.23	0.95 ± 0.20
Calcium, mg/dl	9.6 – 16.8	9.45 ± 1.80	10.63 ± 1.44	10.26 ± 1.82	11.03 ± 2.05	10.43 ± 1.91	10.52 ± 1.04	10.37 ± 1.68
Albumin, g/dl	2.7 – 4.6	5.44 ± 0.83	4.36 ± 1.25	5.03 ± 1.74	4.93 ± 1.62	5.06 ± 1.24	4.99 ± 2.23	4.81 ± 1.76

Total protein, g/dl	5.4 – 7.5	7.60 ± 1.33	8.42 ± 1.28	6.90 ± 2.04	8.36 ± 1.31	8.53 ± 1.83	7.52 ± 1.75	8.04 ± 1.80
High-density lipoproteins (HDL), mmol/dl	32.0 - 56.0	40.26 ± 3.05	49.10 ± 2.97*	45.83 ± 2.25	46.03 ± 2.40	49.13 ± 2.20*	47.99 ± 1.94*	50.08 ± 1.96*
Low-density lipoproteins (LDL), mmol/dL	13.2 – 25.2	14.10 ± 1.12	15.17 ± 1.48	16.32 ± 2.01	15.66 ± 1.29	16.03 ± 1.41	16.82 ± 1.27	17.02 ± 2.04
Plasma fibrinogen, mg/l	500.0 – 1500.0	610.1 ± 33.7	564.7 ± 25.7	460.2 ± 23.7*	464.8 ± 28.1*	430.7 ± 19.7*	434.1 ± 25.6*	404.8 ± 21.5*
Serum globulins, g/dl	2.0 – 4.0	2.36 ± 0.43	2.80 ± 0.82	2.74 ± 0.51	2.68 ± 0.63	2.63 ± 0.39	2.70 ± 0.48	2.51 ± 0.36

Parameters such as low-density lipoprotein, urea, uric acid, creatine, calcium, serum globulin, albumin and total protein did not undergo statistically significant changes. Liver function tests showed that almost all parameters increased in rabbits after experimental infection with MP ($P < 0.05$) (Table 8).

It should be noted that there was a significant jump in the indicators already on the 5th day of the experiment, which may indicate an increased load on the liver and a response to the inflammatory process in infected rabbits. For example, the ALT value increased by 8.37%, AST by 34.67, ALP by 15.78%, and LDH by 21.28%. During the following experimental days, there was a tendency for the concentration of liver enzymes to increase, which was not as progressive as in the first 5 days. On the 30th day, the ALT value was 16.06% higher than the control, AST by 32.63%, ALP by 20.41%.

Table 8. Functional enzymes of rabbit liver in the experiment (n=10)

Parameters	FP	Control	Research Days					
			5	10	15	20	25	30
Alanine aminotransferase (ALT) in yearling rabbits, IU/l	47.4 – 120.0	113.56 ± 5.80	123.07 ± 6.18	121.38 ± 5.82	129.37 ± 4.99*	130.05 ± 6.16*	127.83 ± 5.84*	131.86 ± 6.01*
Alkaline phosphatase, IU/L	57.0 - 254.0	199.05 ± 12.86	230.46 ± 15.05*	228.71 ± 9.42*	231.88 ± 10.92*	226.76 ± 11.51*	235.04 ± 10.83*	239.67 ± 9.59*
Bilirubin, mg/dl	0.4 - 1.2	0.50 ± 0.04	0.59 ± 0.03*	0.60 ± 0.05*	0.58 ± 0.03*	0.58 ± 0.03*	0.61 ± 0.04*	0.59 ± 0.03*
Aspartate aminotransferase (AST), IU/l	30.0 - 98.0	95.00 ± 10.60	127.94 ± 8.30*	131.17 ± 14.65*	129.36 ± 12.58*	128.53 ± 9.58*	130.04 ± 11.74*	126.00 ± 10.31*
Lactate dehydrogenase, IU/l	135,0 - 425,0	420.20 ± 36.51	509.63 ± 48.50	495.10 ± 38.50	510.93 ± 41.32*	519.40 ± 38.65*	512.94 ± 39.66*	515.70 ± 42.23*

2.2.7. Addition of Farnesol to the treatment regimen for rabbits with *Malassezia otitis* and study of its effect on various parameters. Clinical blood testing is one of the most important diagnostic methods, reflecting the reaction of hematopoietic organs to the effects of various physiological and pathological factors, and also allows monitoring the effectiveness of therapy. 35 rabbits were divided into 7 groups of 5 animals. Each group received one of the following drugs:

- 1) Surolan, the active ingredients of which are: miconazole, polymyxin B, prednisolone;
- 2) Otifri ear cleaning lotion with calendula, which contains the following components: water, propylene glycol, emulsifier (Cremophor), calendula;
- 3) Otoxolan contains as active ingredients: marbofloxacin, clotrimazole, dexamethasone; and as auxiliary components propyl gallate, medium-chain triglycerides, sorbitan oleate, anhydrous

colloidal silicon dioxide;

- 4) Surolan + Farnesol 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ in equal proportions;
- 5) Otifri + Farnesol 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ in equal proportions;
- 6) Otoxolane + Farnesol 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ in equal proportions;
- 7) Otipax therapy – control.

All preparations were applied to the entire affected surface of the ear. The treatment was carried out once a day, the duration of treatment was 30 days. Every five days for a month, smears of ear contents were taken from animals of the control and 6 experimental groups and clinical signs of the disease were recorded.

It was found that the use of drugs in combination with Farnesol in animals of the experimental group reduced the signs of hyperemia, edema, itching, the amount of exudate already on the 5th-7th day of treatment, and complete clinical recovery of animals occurred, on average, on the 20th day of the experiment. When using commercial drugs (Surolan; Otifri; Otoxolan) in monotherapy in animals, on average, an improvement in the clinical condition occurred on the 25th day, and final recovery occurred only after a full course of treatment - 30 days. However, when using Otifri, the clinical manifestation of MO persisted throughout the experiment. Animals of the control group also retained clinical signs of the disease throughout the experiment. Their condition worsened in the dynamics of the study, which proves the effectiveness of the MO model in rabbits developed by us. Analyzing the obtained results, it can be said that all treatment regimens with the addition of Farnesol were effective, due to its wide spectrum of action against microorganisms that most often cause otitis, as well as its anti-inflammatory effect.

It is worth noting that in the experimental groups there was not a single case of the presence of MR in smears and on nutrient media after combined therapy with Surolan/Otifri/Otoxolan in combination with Farnesol, already on the 20th day of therapy. At the same time, in the control group, all animals had DPG during microscopy of smears of ear exudate and there was growth on special nutrient media in high concentrations throughout the experiment. It is important to note that when adding Farnesol to any drug, microbiological purification from MR occurred, on average, 5-10 days earlier. At the same time, the best result in this series of experiments was with a combination of Otoxolan + Farnesol, since complete ear sanitation from MR was recorded in animals of this group already on the 10th day of therapy.

Clinical blood parameters of rabbits with MO before treatment were characterized by low values of the red blood cell count - $5.20 \pm 0.34 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$ and hemoglobin - $9.18 \pm 1.07 \text{ g} / \text{dl}$. It is clearly shown that on the 5th-10th days of the experiment, statistically significant differences between the experimental groups and the control group were not observed. On the 15th day of our experiment, statistically significant differences between the experimental and control groups are visible in the platelet level in rabbits receiving daily therapy with Otoxolan + Farnesol. On the 20th, differences are visible in the platelet count and the average concentration of corpuscular hemoglobin in rabbits receiving daily therapy with combinations of Otoxolan + Far; Surolan + Far; Otifri + Far. On the 25th day, differences were recorded in the platelet count; mean concentration of corpuscular hemoglobin and total number of leukocytes in rabbits receiving daily therapy with Otoxolan + Far; Surolan + Far; Otifri + Far and Otoxolan in monotherapy. On the 30th day of our experiment, statistically significant differences were recorded in the platelet level, which was 16.62-14.57% lower in the experimental groups receiving treatment, when compared with the control group. A significant difference was also noticeable when measuring the total number of leukocytes. Moreover, their greatest decrease (by 36.36-39.25%) was observed in the groups receiving Farnesol. The number of erythrocytes in all experimental groups varied in values close to the control, however, significant changes were observed in the hematocrit values, which increased by 27.42% in the group receiving Surolan therapy, by 21.89% - Otifri, by 24.25% - Otoxolan, by 27.64% - Surolan + Far, by 25.96% - Otifri + Far, by 21.21% - Otoxolan + Farnesol, when compared with the control group.

Analysis of biochemical parameters of blood serum of rabbits in the experiment using different treatment regimens demonstrated that there are no statistical differences in biochemical analyses in the first 10 days of the experiment. This means that biochemical balance, even with

adequate treatment, does not occur immediately in the macroorganism. On the 15th, 20th and 25th day of the experiment using different drugs, we see statistically significant differences between the plasma fibrinogen and LDL indices, when compared with the control. By the 30th day of the experiment, some biochemical indices returned to normal values before the experimental infection, especially in the groups of animals with the addition of Farnesol. Thus, high-density lipoproteins on the 30th day of treatment in the Surolan + Far, Otofri + Far and Otoxolan + Far groups were only 13.11%, 16.34% and 13.34% lower, respectively, than in the control group. Plasma fibrinogen in the same experimental groups was 12.39%, 14.22% and 15.98% higher than in the control animals. In addition, on the 25th-30th day of the experiment, analysis of liver samples showed that such parameters as alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase in rabbits that received local treatment differed from the parameters in the control group without treatment ($P < 0.05$). Bilirubin throughout the experimental infection with MR was approximately the same at all times and did not differ statistically in different groups. Normalization of four of the five parameters was again observed more quickly in the groups where Farnesol was added to the treatment regimen.

2.2.8. Inhibition of *Malassezia pachydermatis* biofilm by Farnesol. The average reduction was measured and used to calculate the percentage of biofilm inhibition by Farnesol, where OD AS is the average optical density of the three isolates (MP C23.27 and 3) in the experiment, OD AC is the average optical density of the three isolates (MP C23.27 and 3) in the control without Farnesol (Table 9).

Table 9. Effect of different concentrations of Farnesol on MR biofilms and reduction of average optical density, % densitometric studies

Concentration of headlight Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Control without farnesol	200 μ M	100 μ M	50 μ M	25 μ M	12.5 μ M	6.3 μ M	3.1 μ M	1.6 μ M	0.8 μ M	0.4 μ M	0.2 μ M
MP Cd23	0.441 $\pm$ 0.016	0.120 $\pm$ 0.008	0.135 $\pm$ 0.011	0.234 $\pm$ 0.011	0.226 $\pm$ 0.019	0.233 $\pm$ 0.010	0.249 $\pm$ 0.014	0.302 $\pm$ 0.015	0.368 $\pm$ 0.017	0.407 $\pm$ 0.016	0.439 $\pm$ 0.011	0.453 $\pm$ 0.012
MP Cd27	0.403 $\pm$ 0.026	0.117 $\pm$ 0.016	0.121 $\pm$ 0.009	0.144 $\pm$ 0.013	0.186 $\pm$ 0.018	0.272 $\pm$ 0.016	0.284 $\pm$ 0.011	0.307 $\pm$ 0.008	0.320 $\pm$ 0.014	0.379 $\pm$ 0.012	0.393 $\pm$ 0.010	0.399 $\pm$ 0.010
MP Cd3	0.400 $\pm$ 0.012	0.123 $\pm$ 0.018	0.142 $\pm$ 0.014	0.160 $\pm$ 0.021	0.154 $\pm$ 0.017	0.185 $\pm$ 0.009	0.234 $\pm$ 0.014	0.252 $\pm$ 0.012	0.262 $\pm$ 0.009	0.279 $\pm$ 0.010	0.383 $\pm$ 0.014	0.398 $\pm$ 0.008
Wed OP 3 isolates	0.415	0.120	0.133	0.179	0.189	0.230	0.256	0.287	0.317	0.390	0.405	0.417
Avg. reduction in OP, %	0	71	68	57	54	55	38	31	24	6	2.4	-0.5

Farnesol demonstrated good antibiofilm effects at concentrations above 1.6 μ M/ml (24% reduction in biofilm OD), and its highest results (71-55%) were observed at concentrations of 200-12.5 μ M/ml.

2.2.9. Changes in the sensitivity of the MP strain to antimycotics and the influence of five concentrations of Farnesol on these results. The antibiotic resistance test was performed with the MP Cd23 strain using the standard disk diffusion method on Sabouraud agar. Let us recall that this strain was resistant to AP, KT and FU. Moderately resistant to NS, CC, IT and VOR. And sensitive only to MIC. The disk experiments were performed in triplicate. The data in the table on sensitivity to antimicrobial drugs are given without +/- for a better understanding of the table. +/- did not exceed 0.4. The research results were processed using generally accepted statistical methods and were considered reliable at $p \leq 0.05$. The results of the experiment on changing the sensitivity of MP

to antimicrobial drugs with the addition of Farnesol to the latter are presented in Table 10.

The table shows that the clinical strain MP 23 was completely resistant to Amphotericin B (AP). And with Farnesol, even in small concentrations, this drug began to work. It is also worth noting the results with some drugs, where Farnesol had little effect on sensitivity: for example, with Clotrimazole. The latter nevertheless "gave in" when Farnesol was added in the highest concentration of 200 μ M/ml. There are also unique indicators: the sensitivity of MP to Nystatin, Voriconazole and Ketoconazole increased twofold when Farnesol was added in a concentration of 25-200 μ M/ml.

Thus, in most cases, when adding Farnesol to the experiment, an increase in the sensitivity of the microorganism to medicinal antifungal drugs is recorded compared to the control.

Table 10 - Sensitivity of strain MP to antifungals and the effect of Farnesol concentrations on these results

Name of antimycotic	time	Antifungal only	Antimycotic + PR (control)	Antimycotic + 12.5 Farnesol	Antimycotic + 25 Farnesol	Antimycotic + 50 Farnesol	Antimycotic + 100 Farnesol	Antimycotic + 200 Farnesol
N.S.	24h	10	10	17 (+ 70.0%)	20 (+ 100.0%)	21 (+ 110.0%)	21 (+ 110.0%)	21 (+ 110.0%)
	48h	10	10	16 (+ 60.0%)	16 (+ 60.0%)	18 (+ 80.0%)	18 (+ 80.0%)	18 (+ 80.0%)
AP	24h	0	0	8	10	11	11	11
	48h	0	0	6	10	11	11	11
KT	24h	11	11	18 (+ 63.7%)	19 (+ 72.7%)	19 (+ 72.7%)	20 (+ 81.8%)	22 (+ 100.0%)
	48h	11	11	18 (+ 63.7%)	18 (+ 63.7%)	19 (+ 72.7%)	20 (+ 81.8%)	22 (+ 100.0%)
CC	24h	14	14	14	14	14	14	15 (+ 7.1%)
	48h	13	13	13	13	13	13	15 (+ 15.4%)
VOR	24h	11	11	18 (+ 63.7%)	19 (+ 72.7%)	19 (+ 72.7%)	20 (+ 81.8%)	22 (+ 100.0%)
	48h	11	11	18 (+ 63.7%)	18 (+ 63.7%)	19 (+ 72.7%)	20 (+ 81.8%)	22 (+ 100.0%)
FU	24h	8	8	8	10 (+ 25.0%)	11 (+ 37.5%)	11 (+ 37.5%)	11 (+ 37.5%)
	48h	6	6	6	10 (+ 66.7%)	11 (+ 83.3%)	11 (+ 83.3%)	11 (+ 83.3%)
MIC	24h	17	17	18 (+ 5.9%)	19 (+ 11.8%)	19 (+ 11.8%)	20 (+ 17.6%)	20 (+ 17.6%)
	48h	16	17	18 (+ 5.9%)	18 (+ 5.9%)	19 (+ 11.8%)	20 (+ 17.6%)	20 (+ 17.6%)
IT	24h	13	13	13	14 (+ 7.7%)	14 (+ 7.7%)	14 (+ 7.7%)	15 (+ 15.4%)
	48h	13	13	13	13	14 (+ 7.7%)	14 (+ 7.7%)	15 (+ 15.4%)

	- Farnesol increases the growth inhibition zone
	- Farnesol does not affect the growth inhibition zone

2.2.10. Efficiency of using Farnesol for the treatment of otitis in dogs complicated by *Malassezia pachydermatis*. The study involved 30 dogs with otitis complicated by *Malassezia pachydermatis*. The animals were divided into 2 groups: experimental (n=15) and control (n=15). Clinical blood parameters of dogs with *Malassezia* otitis before treatment were characterized by low values of the red blood cell count - 5.94 ± 0.72 $10^{12}/l$, which cannot be called anemia, but is a borderline value. Also, a decrease in hemoglobin to 127.38 ± 9.34 g/l was observed in sick animals (Table 11). The number of leukocytes in the blood of sick animals was within the normal range of 13.14 ± 3.85 $10^9/l$, but after therapy the number of leukocytes became slightly lower. After treatment, the amount of hemoglobin in the blood of dogs increased to 168.54 ± 8.34 g/l in the experiment and 137.60 ± 9.34 g/l in the control. There is a reliable difference of 1.2 times between these indicators, which indicates a positive effect of Farnesol in the treatment of *Malassezia* otitis. Slight eosinophilia (but within the normal range), which can be observed before the treatment of *Malassezia* otitis, is characteristic of many infectious and invasive diseases, as well as intoxications. Also, before treatment, dogs showed an increase in band neutrophils 9.63 ± 2.03 , which is higher than the physiological norm and also indicates an inflammatory process with small values of

segmented neutrophils 56.28 ± 5.26 . After two weeks of treatment, we can observe an improvement in the clinical parameters of the dogs' blood and even see a statistically significant difference between the experiment and the control in terms of band neutrophils (1.59 ± 0.32 in the experiment and 2.25 ± 0.34 in the control), eosinophils (5.86 ± 1.72 and 8.32 ± 1.62) and hemoglobin levels (168.54 ± 8.14 and 137.60 ± 9.34). We characterize this process as a pronounced inflammatory reaction, manifested by vivid clinical signs, as well as cellular dynamics, which is an important criterion for indicating the disease.

Table 11. Clinical blood parameters of dogs in the experiment

Indicators	FP	Before treatment (n=30)	After treatment	
			Experience (n=15)	Control (n=15)
Erythrocytes, 10 ¹² /l	5.5 - 8.5	5.94 ± 0.72	7.91 ± 0.87	7.12 ± 1.04
Hematocrit, %	37 - 55	38.12 ± 3.98	51.54 ± 3.86	46.02 ± 4.37
Hemoglobin, g/l	120-180	127.38 ± 9.34	$168.54 \pm 8.14^*$	$137.60 \pm 9.34^*$
Leukocytes, 10 ⁹ /l	6 - 17	13.14 ± 3.85	8.54 ± 1.98	11.14 ± 2.61
P, %	0 - 3	9.63 ± 2.03	$1.59 \pm 0.32^*$	$2.25 \pm 0.34^*$
WITH, %	60 - 70	56.28 ± 5.26	61.20 ± 5.45	58.82 ± 5.25
Eh, %	2-12	10.41 ± 3.16	$5.86 \pm 1.72^*$	$8.32 \pm 1.62^*$
M, %	3 -10	4.27 ± 0.84	2.69 ± 0.35	3.13 ± 0.64
B, %	0 - 1	0.06 ± 0.02	0	0
Lymphocytes, %	12 - 30	22.41 ± 3.34	28.66 ± 2.24	27.48 ± 2.57

Thus, when adding Farnesol to the treatment regimen for fungal otitis in dogs, small changes in the clinical composition of the blood are recorded, characterized by an increase in the number of erythrocytes and hemoglobin, a decrease in the number of leukocytes, while the indicators of eosinophils and band neutrophils in the experiment decrease compared to the control.

CONCLUSION

Results of the completed research

1. It was found that malossezia otitis does not depend on the age and breed of animals. When analyzing the obtained data on species diversity, *M. pachydermatis* was most often detected as a monoculture in dogs in 15%, in cats - in 19% of cases, in association with 1 bacterial species - in 9% of dogs and 14% of cats; in association with 2 bacterial species - in 6 and 14%, respectively; in association with 3 bacterial species - in 6 and 13%; in association with 4 or more bacterial species - in 16 and 6%; in association with 1 fungal species - in 6 and 4%; in association with 1 fungal species and 1 bacterial species - in 8 and 15%; in association with 1 fungal species and 2 bacterial species - in 14 and 7%; in association with 1 fungal species and 3 bacterial species - in 11 and 5%. in association with 1 type of fungi and 4 or more types of bacteria - in 9 and 3%, associations of MR in dogs were most often with staphylococci and streptococci, and in cats - with enterobacteria and staphylococci.

2. Analyzing the densitometric indices of all the isolated samples (n=35), it was found that the isolates MP Cd23, Cd27 and Cd3 from dogs were the strongest biofilm producers. The resistance profile of these three microorganisms was as follows: the strain MP Cd23 was resistant to 87.5% of antimycotics; Cd27 to 37.5%; Cd3 to 50%. The relationship between the ability to form biofilms and sensitivity to drugs was also statistically proven.

3. MP strains are able to adhere to dog buccal epithelial cells. Adhesion was more productive for cultures from dogs and less pronounced for strains isolated from cats. The MP isolate Cd23 had the highest adhesion index of 8.28 ± 0.62 and the adhesion coefficient of 70.62 ± 4.91 .

4. When conducting a study on phagocytosis, it was noted that the phagocytic number and MP index of Cd23 were significantly higher than those of other strains and amounted to $83.1 \pm 2.7\%$ and 9.4 ± 1.1 , respectively.

5. *Malassezia* otitis is effectively reproduced *in vivo* in rabbits with vivid clinical signs of the disease. Biochemical studies of the blood serum of experimental animals showed an increase in liver enzymes already on the 5th day of the study: The ALT value increased by 8.37%, AST – by 34.67%. When assessing the results of the hematological study, it is possible to note the presence of an inflammatory process in the body of the infected rabbits. Thus, on the 5th day of the experiment, the number of leukocytes was 4.67% higher than in the control group, and on the 30th day – already 32.27%.

6. The use of drugs (Surolan; Otofri; Otoxolan) + Farnesol in animals of the experimental group reduced the signs of hyperemia, edema, itching, the amount of exudate on the 5th-7th day of treatment, and complete clinical recovery of animals occurred on the 20th day. When using only drugs in animals, on average, the clinical condition improved on the 25th day, and final recovery occurred after a full course of treatment - 30 days, and then when using Otofri once a day, the redness of the ears persisted. In animals of the control group, clear clinical signs of the disease persisted throughout the experiment. Their condition worsened and did not recover on their own, which proves the excellent efficiency of the MO model in rabbits developed by us. The analysis showed that the microbiological parameters of both treatment regimens (with and without the addition of Farnesol) were effective, but the regimen used in the experimental group Far + Surolan / Otofri / Otoxolan gave faster results. When carrying out therapeutic measures In the first 10 days of the experiment, there are no statistical differences in the biochemical blood tests of the rabbits, and by the 30th day of the experiment, some biochemical parameters returned to normal values before the experimental infection, especially in the groups of animals with the addition of Farnesol. Thus, high-density lipoproteins on the 30th day of treatment in the Surolan + Far, Otofri + Far and Otoxolan + Far groups were 13.11%, 16.34% and 13.34% lower, respectively, than in the control group. Similar changes are observed in the results of the hematological analysis.

7. Farnesol has been shown *in vitro* good antibiofilm effects at concentrations above 1.6 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (reduction of biofilm OD by 24%), and its highest antibiofilm effects (71-55% - more than twofold) were observed at concentrations of 200-12.5 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

8. The results of the experiment on changing the sensitivity of MR to antimicrobial drugs showed that Farnesol increases such susceptibility. For example, Amphotericin B began to work with Farnesol even in low concentrations. The culture again became sensitive to Clotrimazole with Far 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$. There are also unique indicators: the sensitivity of MR to Nystatin, Voriconazole and Ketoconazole doubled with the addition of Farnesol at a concentration of 25-200 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

PRACTICAL SUGGESTIONS AND PROSPECTS FOR FURTHER DEVELOPMENT OF THE TOPIC:

1. Conduct diagnostics of isolated microorganisms from the ears of animals with malasseziosis for sensitivity to antibacterial drugs, since this study tested sensitivity only to antifungal agents in the main pathogen. A study of the accompanying flora will help to select the optimal therapeutic dose of Farnesol.
2. Therapy for *Malassezia* otitis should include local Farnesol at a concentration of ≥ 200 $\mu\text{M/ml}$ once daily for 10 days. It is necessary to develop a convenient aerosol form of the drug that combines Farnesol + antibiotic + antimycotic.
3. Conduct clinical trials of MO therapy with Farnesol on dogs and cats. This study also creates prerequisites for studying Farnesol as the main drug for other mycoses in various animals.
4. The results can be used in scientific research, in the educational process when training students in the specialty "Veterinary Medicine", improving qualifications in the diagnosis and treatment of animals with skin pathologies, otitis, as well as in the preparation of textbooks and reference books on veterinary medicine.

LIST OF SCIENTIFIC WORKS IN WHICH THE MAIN PROVISIONS OF THE DISSERTATION ARE PUBLISHED

Scientific papers published in peer-reviewed scientific journals included in the List of Publications Recommended by RUDN

1. **I.R. Olabode**, N.P. Sachivkina, E.V. Kiseleva, A.I. Shchurov. Efficiency of Farnesol for the Treatment of Canine Otitis Complicated by *Malassezia* Pachydermatis / Bulletin of RUDN University. Series: Agronomy and Animal Husbandry. – 2023. - 18(2). - pp. 250—263. doi: 10.22363/2312-797X-2023-18-2-250-263
2. **I.R. Olabode**, N.P. Sachivkina, E.V. Kiseleva, V.I. Kuznetsov, V.I. Semenova. Correlation between the ability to form biofilms and sensitivity to antifungal drugs in *Malassezia* pachydermatis / Veterinary Science, Animal Science and Biotechnology 2023. No. 6. P. 85–95; <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202306011>
3. **Olabode I.R.**, Sachivkina NP, Smolentsev SY. A study of blood parameters in rabbits with otitis caused by *Malassezia* pachydermatis and the effect of Farnesol on recovery rates when added to the treatment regimen. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. 2024;19(4):707—719. doi: 10.22363/2312-797X-2024-19-4-707-719

Scientific papers published in scientific journals indexed in the Web of Science and/or Scopus databases

4. **Ifarajimi Rapheal Olabode**, Nadezhda Sachivkina, Arfenia Karamyan, Ramziya Mannapova, Olga Kuznetsova, Anna Bobunova, Natallia Zhabo, Marina Avdonina and Regina Gurina. In vitro activity of Farnesol against *Malassezia* pachydermatis isolates from otitis externa cases in dogs / Animals. – 2023. – 13. – p. 1259. <https://doi.org/10.3390/ani13071259>

Scientific papers published in regional publications, symposium and conference proceedings

5. **Olabode I.R.** Sensitivity to antifungal drugs of clinical strains of *Malassezia* pachydermatis obtained from dogs with external otitis / Collection of abstracts of the VII All-Russian Congress on Medical Microbiology, Clinical Mycology and Immunology (XXVI KASHKIN READINGS) Problems of Medical Mycology 2023. - 25 (2). - p. 153.
6. **Olabode I.R.** Study of resistance of clinical strains of *Malassezia* pachydermatis / Innovative processes in agriculture: collection of articles of the XV International scientific and practical conference. Moscow, April 20–21, 2023 / edited by E. A. Dovletyarova. – Moscow: RUDN, 2023. – 400 p. – pp. 169–173.
7. Vissarionova V.V., **Olabode I.R.**, Vatnikov Yu.A., et al. Morphological indices of dogs'

blood in the treatment of *Malassezia* otitis using farnesol / XXV All-Russian Student Scientific and Practical Conference of Nizhnevartovsk State University (Nizhnevartovsk, April 4-5, 2023) / Under the general editorship of D.A. Pogonyshev. Part 1. Biology. Ecology. Geography. Life safety. Nizhnevartovsk: NVSU Publishing House, 2023. 221 p. – pp. 42-48.

Ifarajimi Rafeal Olabode. Nigeria

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND METHODS OF TREATMENT OF OTITIS IN SMALL DOMESTIC ANIMALS

Annotation. *The dissertation identified the most powerful Malassezia pachydermatis biofilm producers and the most antifungal-resistant strains. A correlation was demonstrated between the strain resistance to modern antifungals and the ability to form biofilms. It was established how the Malassezia otitis pathogen is able to attach to the buccal epithelium of dogs, how it is phagocytosed and becomes accessible to the action of lysosomal enzymes of macrophages. An original model of acute Malassezia otitis in dogs and cats was proposed. The therapeutic and anti-relapse effect of Farnesol was proven in in vivo experiments. Fungicidal and fungistatic effects of Farnesol were established. It was proven that Farnesol enhances the effect of antifungals. These experiments confirmed the use of Farnesol and the progress of its research in the field of antifungal therapy for external otitis.*

Keywords: *Malassezia pachydermatis, Malassezia otitis, antifungals, therapy, Farnesol, dogs, cats, rabbits.*

Ифараджими Рафеал Олабоде. Нигерия

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ОТИТОВ У МЕЛКИХ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

Аннотация. *В диссертационной работе выявлены наиболее сильные продуценты биопленок Malassezia pachydermatis и наиболее устойчивые штаммы к антимикотикам. Доказана корреляция между устойчивостью штаммов к современным антимикотикам и способностью к образованию биопленок. Было установлено, каким образом возбудитель малассезиозного отита способен прикрепляться к щечному эпителию собак, как он фагоцитируется и становится доступным для действия лизосомальных ферментов макрофагов. Предложена оригинальная модель острого малассезиозного отита у собак и кошек. Терапевтический и противорецидивный эффект Фарнезола был доказан в экспериментах in vivo. Установлено фунгицидное и фунгистатическое действие Фарнезола. Доказано, что Фарнезол усиливает действие антимикотиков. Эти эксперименты подтвердили применение Фарнезола и прогресс его исследований в области противогрибковой терапии наружного отита.*