

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Сухинина Александра Александровича на диссертационную работу Вагановой Анастасии Николаевны на тему “Разработка методики выявления генетических маркеров *Ureaplasma diversum* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени”, представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Болезни, ассоциированные с различными оппортунистическими патогенами, в настоящее время широко распространены среди сельскохозяйственных животных. Одним из патогенов, относящихся к данной группе, является *U. diversum*. Оценка распространённости данных уреаплазм в различных странах показала, что частота носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота может превышать 50%. Бессимптомное носительство *U. diversum* у коров, тем не менее, является одной из ведущих причин абортов. У молодняка крупного рогатого скота колонизация лёгких *U. diversum* может приводить к бронхопневмониям, замедляющим рост и развитие телят, а также, в отдельных случаях, приводящим к гибели.

Поскольку *U. diversum* является оппортунистическим патогеном, её носительство зачастую не сопровождается развитием выраженной симптоматики и активным ростом уреаплазм на поверхности слизистых оболочек животных. В связи с этим важной задачей является разработка высокочувствительных методов определения данного микроорганизма, с помощью которых его выявление будет возможным даже при низком содержании в исследуемом материале.

Метод ПЦР в реальном времени, выбранный Вагановой А.Н. в качестве основы для разрабатываемой в ходе диссертационного исследования методики, широко применяется в диагностических лабораториях, осуществляющих выявление возбудителей заболеваний животных. Таким образом, методика определения *U. diversum*, разработка которой является целью диссертационного исследования Вагановой А.Н. может быть внедрена в работу диагностических лабораторий.

В связи с вышеизложенным, актуальность и обоснованность темы диссертации Вагановой А.Н., посвящённой совершенствованию методов выявления *U. diversum* не вызывает сомнений. Обладающий высокой аналитической чувствительностью и специфичностью метод, позволяющий обнаружить *U. diversum* в биологическом материале, позволит не только своевременно диагностировать болезни, ассоциированные с *U. diversum*, но и снизить негативные последствия распространения данного возбудителя среди поголовья крупного рогатого скота.

Степень новизны и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Цель и задачи, поставленные автором, были выполнены успешно. Результаты исследований, приведённые в диссертационной работе, позволили автору сформулировать положения и выводы, характеризующиеся высокой степенью научной новизны.

В ходе работы Вагановой А.Н. была проведена адаптация и оптимизация метода ПЦР в реальном времени для выявления ДНК *U. diversum* в биологическом материале от крупного рогатого скота. Впервые была разработана диагностическая тест-система, позволяющая выявлять в биологическом материале от крупного рогатого скота ДНК *U. diversum*, с использованием в качестве мишени последовательности 16S рРНК метилтрансферазы, с одновременной идентификацией ДНК крупного рогатого скота. В ходе исследования автором убедительно доказана целесообразность использования выбранной последовательности для обнаружения ДНК *U. diversum*.

Автором впервые проведена комплексная оценка содержания ДНК *U. diversum* в респираторной и репродуктивной системах взрослого крупного рогатого скота, а также в крови животных. При этом установлено, что в носовой полости у 33% обследованных животных выявляется ДНК *U. diversum*, и её присутствие в носовой полости ассоциировано с колонизацией репродуктивной системы.

Впервые проведена оценка распространённости носительства *U. diversum* в репродуктивном тракте разновозрастных коров, в результате которой было

установлено, что у коров старшего возраста носительство встречается значительно реже, чем в младших возрастных группах. Опираясь на данные литературных источников, автор объясняет указанную закономерность тем, что первичное заражение животных происходит в младшем возрасте, при этом развивается в хроническое бессимптомное носительство с последующей элиминацией уреоплазм в старшем возрасте.

Научные положения, выводы и рекомендации автора убедительно аргументированы, чётко сформулированы и логически вытекают из проведённой работы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость представленной работы заключается в обосновании целесообразности применения современных молекулярно-биологических методов для контроля за распространением *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота и выявления случаев ассоциированных с ней заболеваний.

Практическая значимость определяется тем, что разработанная методика выявления *U. diversum* позволяет проводить идентификацию данного возбудителя при его минимальном содержании в исследуемом материале, в том числе после транспортировки материала в условиях, не поддерживающих жизнеспособность микроорганизмов, таких как фиксация в формалине.

Разработанная в процессе исследования и апробированная в производственных условиях методика была использована при создании диагностической тест-системы “Ureaplasma diversum Amp”, соответствие которой требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам (НД №13-5-2/1062 “Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы” (утв. Минсельхозпродом России 17.10.1997)) подтверждено декларацией соответствия, выданной ФГБУ “Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов”.

Автор формулирует показания, при которых целесообразно проводить обследование животных на предмет колонизации органов и тканей *U. diversum*.

Предложенная схема проведения мероприятий по обследованию поголовья и антибиотикопрфилактике была внедрена в работу животноводческого комплекса, что обеспечило повышение сохранности молодняка крупного рогатого скота на 10%. Материалы диссертации используются в работе кафедры биотехнологии биотехнологического факультета Лужского института (филиала) ГАОУ ВО ЛО "Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина" в учебном процессе для студентов бакалавриата.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационного исследования Вагановой А.Н. не вызывает сомнений, так как работа выполнена на достаточно большом объеме материала с использованием современных методов, таких как ПЦР в реальном времени и секвенирование по Сенгеру. Обследовано 121 голова разновозрастного взрослого крупного рогатого скота, а также 52 головы молодняка крупного рогатого скота из поголовья трёх животноводческих предприятий. Методы статистической обработки являются общепринятыми и позволяют оценить достоверность результатов диссертационного исследования.

Разработанная Вагановой А.Н. методика прошла комиссионные испытания в условиях диагностической лаборатории, о чём был составлен Акт, утвержденный директором ФГБУ «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория». Созданный на основании данной методики диагностический набор прошёл испытания на соответствие требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам, что подтверждено декларацией соответствия, выданной ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Материалы диссертационной работы были представлены на 4 профильных научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, 6 – в других изданиях, 5 тезисов в

материалах конференций. Основные результаты исследования представлены на российских и международных конференциях.

Оценка содержания, законченности и оформления диссертации

Диссертация Вагановой А.Н. изложена на 163 страницах машинописного текста, имеет общепринятую структуру и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 217 источников, из которых 22 – отечественных, 195 – зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 11 рисунками, которые служат наглядным представлением результатов и способствуют их восприятию.

Во введении автор обосновывает необходимость проведения исследования и его актуальность, приводит описание степени разработанности темы, обозначает цель работы и формулирует задачи исследования, указывает новизну, теоретическую и практическую значимость работы, перечисляет основные положения, выносимые на защиту. Изложенные во введении методы исследования описаны детально и грамотно, их выбор и диапазон свидетельствуют о высоком методологическом уровне работы.

Обзор литературы состоит из пяти подразделов. Он даёт представление о значении *U. diversum* как оппортунистического патогена крупного рогатого скота, методах диагностики ассоциированных с ней заболеваний и выявления случаев бессимптомного носительства. Отдельные разделы обзора литературы посвящены биологическим особенностям *U. diversum*, распространению *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота в разных странах, свойствам *U. diversum*, определяющим её патогенность и их проявлениям при развитии инфекции у животных, методам выявления *U. diversum* и особенностям иммунного ответа при заражении уреоплазмами данного вида. Представленный подробный обзор и критический анализ рассматриваемой проблемы определил направление собственных исследований автора.

Раздел “Результаты собственных исследований” включает шесть глав, которые посвящены решению представленных в работе задач.

Глава 2 посвящена выбору в геномах *U. diversum* и крупного рогатого скота видоспецифических последовательностей, позволяющих проводить видовую идентификацию данных организмов. В главе подробно описаны требования, предъявляемые к генетическим мишеням для видоспецифического определения ДНК, а также биологические и биохимические особенности последовательностей ДНК, предлагаемых автором в качестве мишеней для разрабатываемой им методики выявления ДНК *U. diversum*. По итогам проведённого исследования литературных данных и геномных последовательностей *U. diversum* и крупного рогатого скота автор предлагает варианты генетических структур в составе геномов указанных организмов, пригодные для подбора праймеров и зондов с целью решения данной задачи. Результаты оценки специфичности биоинформационными методами автор подтверждает иллюстративным материалом и таблицей. Полученные данные закреплены в выводе 1 диссертации.

Глава 3 посвящена оптимизации качественного и количественного состава реакционных смесей для ПЦР в реальном времени, с целью подбора состава реакционной смеси, обеспечивающего одновременное выявление ДНК *U. diversum* и крупного рогатого скота. На основании результатов серии экспериментов, в ходе которых автор оценивает накопление целевых продуктов при ПЦР в реальном времени с использованием различных сочетаний праймеров и зондов к последовательностям генома *U. diversum* и крупного рогатого скота, предлагается наиболее эффективный вариант смеси, включающий системы праймеров и зондов к генам 16 S рРНК метилтрансферазы *U. diversum* и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы крупного рогатого скота. В процессе оптимизации количественного состава разрабатываемой реакционной смеси, автор проводит серию экспериментов, в которых компоненты реакционной смеси, предназначенные для специфической индикации ДНК *U. diversum* и крупного рогатого скота вносятся в реакцию в различных количественных соотношениях. При этом оценивается способность реакционной смеси обеспечивать накопление специфических продуктов при

проведении ПЦР в реальном времени на матрице ДНК *U. diversum* в различных концентрациях в присутствии ДНК крупного рогатого скота. На основании данной серии экспериментов проводится отбор оптимального соотношения компонентов реакционной смеси, обеспечивающий аналитическую чувствительность до 10 геномных эквивалентов *U. diversum* на аликвоту исследуемого материала. В завершении главы описывается методика изготовления контрольных образцов. Чтобы избежать использования в качестве положительного контроля ДНК патогенных организмов, предлагается методика изготовления контрольной плазмиды. Полученные данные закреплены в выводе 2 диссертации.

В главе 4 собственных исследований рассмотрены результаты проведённой экспериментальной работы по оценке аналитической специфичности, а также стабильности и воспроизводимости результата ПЦР в реальном времени, получаемого при использовании реакционной смеси предлагаемого состава. Автором проведены постановки ПЦР с ДНК близкородственных *U. diversum* патогенов, а также ДНК патогенов, вызывающих заболевания крупного рогатого скота со схожей симптоматикой. Полученные данные подтверждают результаты исследования *in silico*, указывающие на высокую аналитическую специфичность системы, хорошую воспроизводимость результатов исследования биологического материала, получаемых при её применении, как при качественной, так и при количественной оценке накопления целевого продукта в реакции ПЦР в реальном времени. Завершающие разделы главы посвящены дизайну набора для выявления ДНК *U. diversum* в биологическом материале от крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени для использования в практических диагностических лабораториях. Приводится состав набора и методика подготовки реагентов. Результаты, описанные в данной главе, отражены в выводе 3.

Глава 5 посвящена оценке применимости разработанной методики выявления ДНК *U. diversum* для исследования клинического и патологического материала различных типов. Автором установлено, что наиболее информативным при обследовании взрослых животных на предмет колонизации организма *U. diversum* является исследование материала, отобранного с поверхности слизистых оболочек

преддверия влагалища. При необходимости исследования патологического материала, автор, на основании проведённого исследования, рекомендует при транспортировке проводить его фиксацию в формалине. Также в данной главе освещены результаты, полученные при оценке влияния колонизации репродуктивной системы животных *U. diversum*. Показанное выраженное снижение способности к оплодотворению у животных младшего возраста при колонизации преддверия влагалища *U. diversum* указывает на экономическую целесообразность контроля за распространением данного оппортунистического патогена среди здоровых животных. Полученные результаты представлены в выводах 4 и 6.

В главе 6 собственных исследований приводятся полученные автором данные о распространённости *U. diversum* среди здоровых животных различных возрастных групп. При широком распространении *U. diversum* среди поголовья взрослого крупного рогатого скота, случаи выделения данного оппортунистического патогена из респираторного тракта здоровых телят редки. Полученные автором данные о распространённости носительства *U. diversum* среди крупного рогатого скота, в целом, согласуются с литературными данными, хотя следует отметить, что этот показатель среди взрослых животных значительно выше, чем в странах Европы. Автор указывает на то, что носительство *U. diversum* чаще выявляется у взрослого крупного рогатого скота младших возрастных групп. Результаты, полученные в ходе описанного в главе 6 этапа исследования, обобщены в выводе 5.

Глава 7 описывает разработанные автором подходы к обследованию крупного рогатого скота различных возрастных групп на предмет носительства *U. diversum*, к диагностике ассоциированных с данным оппортунистическим патогеном заболеваний. В заключительной части данной главы автор приводит результаты, полученные при организации мероприятий по профилактике бронхопневмоний молодняка в условиях животноводческого предприятия, где были выявлены случаи носительства *U. diversum* среди взрослых коров и случаи гибели молодняка, связанные с бронхопневмонией, в качестве этиологического агента которой выступала *U. diversum*. Проведённые мероприятия предполагали однократное введение телятам азитромицина и позволили в течение полутора месяцев снизить

заболеваемость молодняка и предотвратить гибель молодняка, связанную с заболеваниями респираторного тракта. Автор также подробно объясняет и обосновывает причины выбора данного препарата для использования в профилактических целях. Результаты, представленные в данной главе, обобщены в выводе 6.

В разделе “Заключение” обобщены результаты проведённых исследований. Автором проведён анализ итогов проделанной работы с учётом данных литературных источников. Анализ полученных данных позволил автору прийти к заключению о существенности экономического ущерба, наносимого животноводческой отрасли оппортунистическим патогеном *U. diversum*, с учётом того, что порядка 50% взрослых животных из поголовья животноводческих предприятий Северо-западного федерального округа России являются носителями уреаплазм данного вида. Опираясь на данные диссертационного исследования автор предлагает меры по контролю за распространением *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота и предотвращения связанных с данными уреаплазмами заболеваний.

В целом, автором было проведено объёмное исследование, в результате которого были полностью решены задачи, поставленные в работе. Диссертационная работа Вагановой А.Н. является логичным, аргументированным и полноценным научным исследованием. Принципиальных замечаний к диссертации нет. Автореферат диссертационной работы Вагановой А.Н. адекватно отражает содержание диссертации.

Вопросы к автору:

1. На стр.119 Вы пишете что “.... культуральный метод в настоящее время даёт возможность выделить *U. diversum* только от павших животных....”. Возникает вопрос: “Какую питательную среду в ветеринарных лабораториях в настоящее время лучше использовать для выделения возбудителя из исследуемого материала при жизни животного?”.

2. При отборе материала Вами отмечалось наличие сыпи в области наружных половых органов у животных. Как проводилась дифференциальная диагностика от

других инфекционных болезней, сопровождающихся сыпью и в частности от ринотрахеита КРС.

3. Предложенная Вами схема профилактики включала однократную инъекцию, проводимую в первый день жизни телёнка после выпойки молозива. Контролировался ли Вами в последующие дни микробиоценоз кишечника теленка?
4. Каковы были причины гибели телят в хозяйстве А до введения антибиотикопрофилактики с использованием препарата “Азитронит” (в январе 2018 года) и после её введения (в феврале-апреле 2018 года), отмечались ли после введения антибиотикопрофилактики случаи гибели телят, связанные с бронхопневмониями?
5. Какие могут быть приняты меры по контролю за распространением *U. diversum* среди поголовья взрослого крупного рогатого скота?
6. Каковы перспективы вакцинопрофилактики заболеваний, ассоциированных с *U. diversum*?

Заключение.

Диссертационная работа Вагановой Анастасии Николаевны на тему “Разработка методики выявления генетических маркеров *Ureaplasma diversum* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени”, представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология, является завершённым научно-квалификационным трудом, выполненным под руководством кандидата биологических наук, Фрейлихман Ольги Александровны и доктора биологических наук, Суцкого Евгения Владимировича, содержащим решение актуальной задачи – совершенствования методов контроля за заболеваниями крупного рогатого скота, связанными с условно-патогенной микрофлорой, имеющей большое научно-практическое значение.

По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Вагановой Анастасии Николаевны “Разработка методики выявления генетических маркеров *Ureaplasma diversum* методом полимеразной

цепной реакции в реальном времени” отвечает п. 9 Положения “О порядке присуждения учёных степеней”, утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля № 335, от 2 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 1 октября 2018 года № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор Ваганова Анастасия Николаевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, первый проректор (проректор по учебно-воспитательной работе) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

196084, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Черниговская ул., д. 5.

Телефон: +7 (812) 388 27 56, адрес электронной почты:
secretary@spbgavm.ru.

доктор биологических наук,
профессор

Сухинин Александр Александрович

19 апреля 2019 г.

Подпись Сухинина Александра Александровича заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»,

доктор ветеринарных наук, доцент



Гаврилова Надежда Алексеевна