

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Раковской Ирины Валентиновны на диссертационную работу Вагановой Анастасии Николаевны «Разработка методики выявления генетических маркёров *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.** Самые первые данные о причастности уреаплазм к заболеваниям крупного рогатого скота были опубликованы в 1967 г. В 1970 г. были описаны случаи пневмонии у телят, а в 1974 г. воспаления половых органов, вызванные *U. diversum*. В настоящее время известно, что эти инфекции широко распространены во всем мире. Выявляется в высоком проценте случаев (до 100%) у коров в острой стадии заболевания и в 75% при хронической форме. У клинически здоровых животных уреаплазма может быть выявлена у 20% животных (по данным литературы). Не так давно диагноз *U. diversum* - инфекция ставили только на основании выделения уреаплазм из лёгких и половых органов коров и быков и обнаружения специфических антител в нескольких серологических реакциях. Однако, эти методы имеют существенные недостатки. Ложно-отрицательные результаты при культуральной диагностике могут быть связаны с высокой требовательностью возбудителя к качеству питательной среды, а при серодиагностике с малой иммуногенностью уреаплазм из-за отсутствия у них сильных антигенов клеточной стенки, которой, как известно, нет у всех представителей класса *Mollicutes*. В настоящее время на смену этим методам пришли молекулярно-генетические: ПЦР и ПЦР в реальном времени. При использовании этих методов сокращается время исследования и повышается его точность. Широкое распространение бессимптомного носительства представителей класса *U. diversum* диктует

необходимость своевременно выявлять инфекционный агент, чтобы во время принять меры по ограничению его распространения.

В России есть две диагностические отечественные тест-системы: «Уреаплазмоз» (*Ureaplasma* sp. ООО «Фрактал Био») и тест-система на основе микрочипов, производства ГК «Люмекс». Обе они имеют определённые недостатки. Первая определяет возбудителя только до рода, для второй требуется специальное оборудование. Поэтому разработка отечественной высокочувствительной тест-системы весьма актуальна для животноводческих хозяйств по всей России.

**Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации.** А.Н. Ваганова разработала диагностическую тест-систему, позволяющую выявлять ДНК *U. diversum* в клиническом материале от больных животных и носителей. Эта тест-система основана на использовании в качестве мишени последовательности гена 16S РНК метилтрансферазы. Преимущества разработанной тест-системы заключаются в том, что кроме выявления ДНК *U. diversum* она определяет видовую принадлежность ДНК и исключает ложно-отрицательные результаты, обусловленные деградацией ДНК, на что автор получила справку о приоритетности на регистрацию изобретения. Таким образом, представленные в работе данные свидетельствуют об их новизне и обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций для животноводческих хозяйств.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическое значение работы определяется выбором оригинальной мишени для создания тест-системы и последующим конструированием тест-системы для выявления *U. diversum*. Исследована специфичность и чувствительность созданной тест-системы. Практическое значение работы определяется возможностью использовать данную тест-систему для выявления инфекции

в животноводческих хозяйствах в России и проведения профилактических мероприятий, алгоритм которых автор разработала.

**Достоверность и апробация результатов исследования.** Достоверность данных, представленных в диссертации, не вызывает сомнения, поскольку они были получены при использовании современных методов исследования и детального статистического анализа. Данные диссертации были доложены на 4-х конференциях, одна из них международная и на международной выставке-конкурсе «Биоиндустрия 2018 г.» в Санкт-Петербурге. Диссертация одобрена на заседании Учёного совета ФБУН НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол №9 от 26 сентября 2018 г.).

**Оценка содержания и оформления документов.** Представленные в диссертации данные полностью соответствуют теме заявленного исследования. Рукопись написано грамотно, лаконично. Собственные исследования представлены в 6 главах. Результаты анализа полученных данных приводятся в главах: Заключение, Выводы и Практические рекомендации. Указатель литературы включает 217 источников, из которых 22 отечественные работы, остальные зарубежные. Значительную часть составляют работы, опубликованные в последние годы. Все работы цитируются в тексте диссертации. В диссертации 11 рисунков, 14 таблиц и 1 приложение.

**Соответствие специальности.** Содержание работы соответствует специальностям 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» и 03.02.03 – «микробиология». Результаты работы имеют теоретическое и народно-хозяйственное значение, т.к. на их основе может быть организована борьба и профилактика серьёзного заболевания крупного рогатого скота, приносящего значительный экономический ущерб животноводству на всей территории России.

Работа построена не совсем обычно по следующему плану: Введение, далее (что не обычно) Методическая глава, затем обзор литературы, 6 глав Результаты собственных исследований, Заключение, Выводы и Приложение. Автор отошла от общепринятой схемы представления материала, которая и в случае данной диссертации мне кажется более логичной.

В главе Обзор литературы приводятся сведения о систематике уреаплазм, их биологических свойствах, факторах патогенности, строении генома и метаболических путях. Приводятся сведения о распространении инфекции в разных странах. Данные сильно варьируются от нескольких процентов до 70-80% и даже 100% при бесконтрольном скрещивании (Канада). Кажется целесообразным представление этих данных в виде таблицы (для наглядности), что автор, к сожалению, не сделала. Целесообразно, на мой взгляд, представление в виде таблицы и разнообразие патологических симптомов у животных в зависимости от пола и возраста. Обзор содержит сведения о механизмах патогенеза уреаплазменных инфекций и ускользания уреаплазм от иммунной защиты хозяина.

Обзор читается с интересом, написан хорошим литературным языком. Единственное замечание – отсутствие сведений о молекулярно-генетических зарубежных тест-системах. Трудно себе представить, что такие системы у зарубежных коллег отсутствуют, ведь проблема уреаплазмозов у крупного рогатого скота – это проблема всех животноводческих хозяйств во всем мире.

В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования. Подробно описаны методы секвенирования 16S РНК *U. diversum*, получение очищенных ампликонов и дальнейший их анализ. В GenBank имеются данные о полногеномном секвенировании только одного штамма *U. diversum*. На

основании этих данных были выбраны в качестве мишени гены метилтрансферазы, сериновой киназы и гемолизина. Системы к второму и третьему гену оказались непригодными, как показали дальнейшие испытания и автор остановилась на метилтрансферазе в качестве кандидата для создания тест-системы.

Специфичность тест-системы была проверена на 30 изолятах *M. hominis*, 7- *U. parvum*, 7 – *U. urealyticum*, 2 образцах *M. bovis*, 3 образцах *M. bovis genitalium*, а также на вакцине против хламидиозов и риновируса крупного рогатого скота. *M. bovis* и *M. bovis genitalium* были включены в изучение специфичности тест-системы, поскольку они широко распространены среди поголовья крупного рогатого скота разного возраста и являются серьёзными патогенами. Всего автор обследовала 121 разновозрастных животных и 52 телят на трёх животноводческих фермах. Носительство среди коров всех трёх животноводческих хозяйств составило 53-54%, при этом доля инфицированности нетелей составила 75%.

Эти цифры выше, чем у зарубежных исследователей (13-53%), что, по мнению автора, связано с интенсификацией животноводства и содержанию животных на больших фермах, тогда как за рубежом это в основном мелкие хозяйства. У телят инфекция была выявлена автором у 4% животных.

Охарактеризована не только специфичность, но и чувствительность тест-системы. Она обнаруживает 10 ГЭ на аликвоту исследуемого материала, 50 клеток на 1 мл спермы, 250 клеток на 1 г ткани, что свидетельствует о её высокой чувствительности.

Автор исследовала диагностическую ценность различных клинических материалов и показала, что наиболее диагностически значимыми являются результаты исследования мазков из преддверия влагалища у коров. Исследование крови оказалось менее информативным, чем образцов из носовой полости и половых органов. При этом

носительство в носовой полости, как правило, ассоциируется с носительством в половых органах.

В процессе изготовления тест-системы изучены многочисленные принципиальные и технические вопросы: от поиска видоспецифичных генетических мишеней и подбора систем праймеров и зондов к выбранным участкам генома *U. urealyticum* до разработки условий, обеспечивающих сохранность ДНК, использование криопротектора для предотвращения гибели уреаплазм при заморозке, влияние фиксаторов для сохранения ДНК в патологическом материале для гистологических исследований.

Автор изготовила 3 серии тест-системы на 100 анализов. С помощью этой тест-системы исследована этиологическая роль *U. diversum*. Показано, что бессимптомное носительство в органах половой системы коров серьёзно сказывается на их репродуктивных качествах, в частности их способности к оплодотворению. У телят инфекция приводит к развитию бронхопневмонии, часто заканчивающейся гибелью животных.

Автор предложила алгоритм диагностических исследований и схему профилактических мероприятий. Одно из этих профилактических мероприятий – однократное введение азитромицина в первые дни жизни телят, когда их иммунная система ещё не сформировалась. Сохранность телят при этом увеличивалась на 10%. Этот раздел работы, вероятно будет продолжен автором. Предстоит выяснить, почему азитромицин помог только 10% телят и как долго сохраняется его защитный эффект после выведения препарата из организма телят (спустя 40 дней). Ответы на эти вопросы будут выяснены при дальнейшей разработке темы. При дальнейшей разработке темы автор собирается организовать промышленное производство тест-системы «*Ureaplasma diversum* Amp» и внедрить её в работу практических лабораторий на территории Северо-западного региона Российской Федерации.

Автореферат полностью отражает содержание и основные результаты диссертационной работы и оформлен в соответствии с ГОСТ 7.0.11-2011с.

Диссертация не содержит некорректных заимствований, в ней не просматривается конфликт интересов.

**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, Сусского Евгения Владимировича, содержащим решение актуальной задачи – усовершенствование методов лабораторной диагностики заболеваний респираторного и репродуктивного трактов крупного рогатого скота.

Диссертационная работа Вагановой Анастасии Николаевны «Разработка методики выявления генетических маркёров *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, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, по объёму проведённых исследований соответствует требованиям 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 2016 года № 335, от 02 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.

Доктор биологических наук, заведующая лабораторией микоплазм и L-форм бактерий Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения,  
123098, г.Москва, ул.Гамалеи, дом 18  
тел. (499)193-3001  
факс (499)193-6183  
e-mail info@gamaleya.org

доктор биологических наук

Раковская Ирина Валентиновна  
25 апреля 2019

Подпись Раковской Ирины Валентиновны заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения,

кандидат биологических наук



Кожевникова Людмила Кондратьевна