

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической
промышленности»

141142, Московская обл., Щелковский р-н, пос. Биокомбината
Тел/ Факс 8 (49656)7-32-63 e-mail: ynitibp@mail.ru
ИНН 5050007071 КПП 505001001 ОГРН 1035010214436

«16» апреля 2019 г. № 01/176

Утверждаю

ВРИО директора ФГБНУ
«Всероссийский научно-
исследовательский и
технологический институт
биологической промышленности»
член-корреспондент РАН

С.А. Гринь

«16» апреля 2019 года



ведущей организации **Федерального Государственного бюджетного научного учреждения “Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности”** Министерства науки и высшего образования Российской Федерации о научно-практической ценности диссертационной работы Вагановой Анастасии Николаевны на тему “Разработка методики выявления генетических маркеров *Ureaplasma diversum* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени”, представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Здоровье животных является основой для получения полноценных продуктов питания животного происхождения и высокой продуктивности животноводческих предприятий. Интенсивная эксплуатация крупного рогатого скота с целью получения максимального количества продукции, молока и мяса,

обуславливает ослабление естественной резистентности организма, и, как следствие, возникновение заболеваний, причиной которых является условно-патогенная микрофлора. В связи с этим, в современных условиях особое значение в структуре заболеваемости крупного рогатого скота занимают патологии, обусловленные условно-патогенными бактериями, в том числе *U. diversum*.

Разработка современных высокочувствительных методов выявления патогенов, вызывающих заболевания сельскохозяйственных животных, является важной задачей для обеспечения продовольственной безопасности. В настоящее время общепринятой методики выявления *Ureaplasma diversum* с использованием бактериологических методов не разработано, и применяемые для индикации данного оппортунистического патогена подходы базируются на молекулярно-биологических методах, таких как ПЦР и ПЦР в реальном времени. Тест-системы, разработанные для решения данной задачи и доступные для диагностических лабораторий России, не обладают достаточной аналитической специфичностью, поскольку рассчитаны на выявление уреаплазм различных видов, или требуют использования специализированного оборудования для постановки ПЦР в формате микрочипа.

Распространённость *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота различных стран варьирует, однако сведений о частоте носительства и вкладе в структуру инфекционной заболеваемости крупного рогатого скота уреаплазм данного вида на территории Российской Федерации на сегодняшний день недостаточно. В Финляндии, являющейся страной с развитым молочным производством, и имеющей общую границу с Россией, данный оппортунистический патоген является одной из ведущих причин абортос у крупного рогатого скота. В различных странах показатели распространённости носительства *U. diversum* среди поголовья животноводческих предприятий варьируют от 13 до 53%, при этом в странах Европы этот показатель высок и может достигать 40%. Исходя из вышесказанного, разработка методов

выявления *U. diversum* у крупного рогатого скота и их внедрение для контроля за распространением данного оппортунистического патогена среди поголовья животноводческих предприятий в России является актуальной задачей.

Своевременная диагностика заболеваний, ассоциированных с оппортунистическим патогеном, такими как *U. diversum* часто затруднена из-за слабо выраженной симптоматики и распространённости случаев бессимптомного носительства. Выявление влияния условно-патогенной микрофлоры на состояние здоровья сельскохозяйственных животных и их продуктивность способствует обоснованию необходимости контроля за распространением оппортунистических патогенов среди животных и организации мер по снижению наносимого ими экономического ущерба.

Таким образом, тема диссертационной работы Вагановой Анастасии Николаевны, посвящённая совершенствованию молекулярно-генетических методов выявления *U. diversum* и лабораторной диагностике ассоциированных с данным условно-патогенным микроорганизмом заболеваний, является важной и актуальной.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основу научной новизны результатов, полученных Вагановой А.Н., составляет разработка способа выявления 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 работы диссертантом была оптимизирована методика идентификации генетических маркеров *U. diversum*, обеспечивающая достоверность результатов диагностического исследования за счёт исключения ложноотрицательных результатов, обусловленных деградацией ДНК в исследуемом материале. В качестве положительного контроля реакции автор предлагает использовать плазмиду, включающую фрагмент ДНК *U. diversum*, разработанную в ходе

диссертационного исследования. Новизна разработанного автором подхода к выявлению *U. diversum* в условиях диагностической лаборатории подтверждена получением положительного решения по заявке на изобретение № 2018120414 «Способ выявления и количественной оценки содержания ДНК *U. diversum* методом ПЦР в реальном времени в материале от взрослого крупного рогатого скота» и включением предложенного метода в открытый реестр изобретений РФ.

Результаты, представленные в диссертационной работе, указывают на пригодность разработанной методики как для лабораторной диагностики заболеваний крупного рогатого скота, ассоциированных с *U. diversum*, так и для выявления случаев бессимптомного носительства в репродуктивной и респираторной системе взрослых животных и молодняка. Разработанная автором методика позволяет выявлять ДНК *U. diversum* с аналитической чувствительностью до 10 геномных эквивалентов на аликвоту исследуемого материала, что достигается за счёт высокой эффективности реакции амплификации с использованием предложенной методики, достигающей 98%. Оценка аналитических характеристик предложенной методики показала высокую воспроизводимость результата при повторных постановках ПЦР в реальном времени. Значение коэффициента вариации числовых показателей содержания ДНК *U. diversum* при трехкратной постановке ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК, выделенной из одного и того же образца, не превышало 1%.

Автором впервые было показано, что присутствие ДНК *U. diversum* в респираторном тракте широко распространено среди взрослого крупного рогатого скота, при этом установлено, что присутствие в носовой полости животного ДНК *U. diversum* ассоциировано с колонизацией репродуктивной системы данными уреаплазмами. Также в ходе проведённого исследования впервые было выявлено присутствие ДНК *U. diversum* в периферической крови животных, сопутствующее колонизации данным оппортунистическим

патогеном слизистых оболочек респираторной и репродуктивной систем. Как отмечается в работе, присутствие ДНК *U. diversum* может быть как следствием фагоцитоза уреаплазм, так и отражением бактериемии.

В представленной диссертационной работе впервые была проведена сравнительная оценка распространённости носительства *U. diversum* в репродуктивном тракте разновозрастных коров, в результате которой было установлено, что частота носительства *U. diversum* среди нетелей, коров-первотёлок, и коров после второго отёла значительно выше, чем среди коров старших возрастных групп.

На основании собственных данных и данных литературных источников автором были предложены рекомендации по организации обследования поголовья крупного рогатого скота на предмет колонизации органов и тканей *U. diversum*. Также были сформулированы показания для проведения подобного обследования среди взрослого поголовья и молодняка.

В ходе работы автором была предпринята успешная попытка внедрения разработанных им методики и схемы обследования поголовья крупного рогатого скота в работу животноводческого комплекса и диагностической лаборатории. Организация антибиотикопрофилактики заболеваний, ассоциированных с *U. diversum*, позволила на 10% снизить потери молодняка крупного рогатого скота в условиях животноводческого предприятия.

В целом, используемые материалы, применённые экспериментальные методы и методы обработки данных, а также объём проведённых исследований обеспечивают выполнение поставленных перед диссертантом задач и научное обоснование выводов и рекомендаций.

Выводы обоснованы и соответствуют результатам проведённых исследований.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Вагановой А.Н. выполнена в рамках научно-исследовательской работы Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека “Динамический мониторинг распространенности инфекций передаваемых половым путем, характеристика популяций возбудителей на основе геномного и протеомного подхода” (Рег. № АААА-А16-116061410016-5) и соответствует направлениям, предусмотренным Доктриной продовольственной безопасности Российской Федерации, утвержденной Указом Президента Российской Федерации от 30.01.2010 № 120.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Практическая ценность работы определяется возможностью использования предложенного автором способа выявления ДНК *U. diversum* при диагностике заболеваний репродуктивной и респираторной систем крупного рогатого скота, исследовании патологического материала абортированных плодов и погибших животных. Повышение точности диагностического исследования с помощью предложенной методики достигается за счёт высоких показателей аналитической чувствительности и аналитической специфичности тест-системы, а также за счёт одновременного выявления ДНК крупного рогатого скота в исследуемом материале с целью контроля качества препарата ДНК.

Автором получены новые сведения, указывающие на роль *U. diversum* как этиологического агента заболеваний молодняка крупного рогатого скота, а также на негативное влияние *U. diversum* на продуктивность взрослого крупного рогатого скота. Отмеченное снижение способности нетелей к

оплодотворению при колонизации слизистых оболочек репродуктивной системы *U. diversum* обуславливает необходимость обследования крупного рогатого скота на предмет носительства *U. diversum* при снижении показателей эффективности оплодотворения животных. Поскольку взрослые животные младшего возраста составляют значительную часть поголовья животноводческих предприятий в Российской Федерации, выявленное автором широкое распространение носительства *U. diversum* в данной возрастной группе и его негативное влияние на репродуктивные качества животных может приводить к недополучению мясной и молочной продукции и связанному с этим экономическому ущербу животноводческой отрасли.

Достоверность результатов исследования не вызывает сомнения. Работа основана на большом объёме материала, современных методах исследования биологического материала и обработки полученных данных. В работе использованы общепринятые методы исследования, в том числе бактериологические, молекулярно-биологические, биоинформационные и статистические методы.

Полученные автором результаты внедрены в работу животноводческого комплекса ОАО «Партизан», где были проведены диагностические исследования поголовья крупного рогатого скота на предмет бессимптомного носительства *U. diversum* с использованием разработанной автором методики, а также установлена связь респираторных заболеваний молодняка с данными уреаплазмами. На указанном животноводческом комплексе были проведены предложенные автором мероприятия по профилактике заболеваний телят, приведшие к повышению сохранности телят до 1,5 месячного возраста. Материалы диссертации успешно используются в работе кафедры биотехнологии биотехнологического факультета Лужского института (филиала) ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина» в учебном процессе по дисциплинам «Основы биохимии и

молекулярной биологии», «Прикладная биотехнология» и «Основы животноводства».

Диссертантом опубликовано 14 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, 6 – в других изданиях, 5 тезисов в материалах конференций.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования Вагановой А.Н. могут быть использованы в преподавании курсов микробиологии и инфекционных болезней животных при чтении лекций и проведении практических занятий в ветеринарных ВУЗах и учебных программах последиplomного дополнительного образования ветеринарных врачей. Предложенная методика легла в основу разработки диагностической тест-системы, которая может применяться в диагностических лабораториях с целью обследования крупного рогатого скота при бронхопневмониях молодняка и снижении репродуктивных качеств взрослых животных. Качество данной тест-системы подтверждено Декларацией соответствия требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам (НД №13-5-2/1062 “Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы” (утв. Минсельхозпродом России 17.10.1997)).

Полученные автором результаты должны быть введены в повседневную практическую деятельность лабораторий, осуществляющих диагностику инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и работу ветеринарных врачей на животноводческих предприятиях, занимающихся разведением крупного рогатого скота.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Результаты исследования Вагановой А.Н. обсуждены и отзыв одобрен на научной конференции отдела молекулярной биологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Протокол № 2 от 15 апреля 2019 года).

Заключение

Диссертационная работа Вагановой Анастасии Николаевны “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, выполненная под руководством кандидата биологических наук Фрейлихман Ольги Александровны и доктора биологических наук Сусского Евгения Владимировича, содержит новое решение актуальной научной задачи – совершенствование и апробация молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики уреаплазмоза крупного рогатого скота и выявления *U. diversum*, основанных на ПЦР в реальном времени.

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.

Заведующая отделом молекулярной биологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,

доктор биологических наук, профессор

Матвеева Ирина Николаевна

Адрес: 141142, Московская область, Щелковский р-н, пос. Биокомбината

Телефон: +7 (496) 567-32-63, адрес электронной почты: vnitibr@mail.ru

Подпись Матвеевой Ирины Николаевны заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,

кандидат биологических наук



Фролов Юрий Дмитриевич