

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.046.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМ Г. Н. ГАБРИЧЕВСКОГО» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 16.05.2019 года №2.

О присуждении Вагановой Анастасии Николаевне, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка методики выявления генетических маркеров *Ureaplasma diversum* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени» по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология принята к защите 12.03.2019 г., протокол № 2 диссертационным советом Д.208.046.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10). Диссертационный совет учреждён приказом Министерства образования и науки РФ №714 / нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 года, приказ №1577 / нк от 16.12.2016 част. изм.

Соискатель Ваганова Анастасия Николаевна, 1986 года рождения. В 2009 году окончила Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский Государственный Университет» по направлению «Биология». Работает с 2016 года в должности лаборанта-исследователя, с 2017 года в должности младшего научного сотрудника, с 2018 года и по настоящее время в должности научного сотрудника лаборатории молекулярно-биологических технологий Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярно-биологических технологий Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научные руководители – кандидат биологических наук (03.02.03 – микробиология) Фрейлихман Ольга Александровна, Федеральное бюджетное учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория молекулярно-биологических технологий, заведующая; доктор биологических наук (03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)) Сусский Евгений Владимирович, Федеральное казённое предприятие «Армавирская биологическая фабрика» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, директор.

Официальные оппоненты: Сухинин Александр Александрович – доктор биологических наук (03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)), профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, первый проректор (проректор по учебно-воспитательной работе), кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, заведующий кафедрой; Раковская Ирина Валентиновна – доктор биологических наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория микоплазм и Л-форм бактерий, руководитель лаборатории.

Ведущая организация: Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (пос. Биокомбината, Московская область) в своём положительном заключении, подписанном Матвеевой Ириной Николаевной, доктором биологических наук, профессором, отдел молекулярной биологии и вирусологии, заведующая, указала, что диссертация является работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи – совершенствования и апробации молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики уреоплазмоза крупного рогатого скота и выявления *U. diversum*, основанных на ПЦР в реальном времени. Предложенная методика позволит выявлять *U. diversum* в биологическом и патологическом материале от крупного рогатого скота при заболеваниях, ассоциированных с данным оппортунистическим патогеном, и его бессимптомном носительстве.

Соискатель имеет 30 опубликованных работ, в том числе 14 работ по теме диссертации, из них 3 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 6 – в других изданиях, 5 тезисов в материалах конференций, общим объёмом 67 страниц и авторским вкладом 45 страниц. Наиболее значимые работы: 1) Ваганова, А.Н. Гистотехнические решения для повышения качества препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков / А.Н. Ваганова // Гены и клетки. – 2014. – т. 9. - № 2. – С. 96-101; 2) Ваганова, А.Н. Молекулярные основы устойчивости патогенных для человека микоплазм к фторхинолонам / А.Н. Ваганова // Инфекция и иммунитет. – 2017. — т. 7. - № 3. – С. 231-244; 3) Ваганова, А.Н. Ген 16S рРНК метилтрансферазы как мишень для выявления *Ureaplasma diversum* в биологическом материале / А.Н. Ваганова // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2018. – № 47. – С. 73-77.

На диссертацию и автореферат поступило 5 положительных отзывов без замечаний от 1) к.в.н. Луницина А.В., заместителя директора по производству и качеству Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; 2) д.м.н., доцента Малышева В.В., профессора кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия

имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации; 3) к.в.н. Новиковой О.Б., заведующей отделом микробиологии «Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства» филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства»; 4) д.б.н., доцента Виноходова Д.О., заведующего кафедрой молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский Государственный Технологический Институт (Технический Университет)» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; 5) к.б.н. Мигуновой А.В., старшего преподавателя кафедры микробиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». В отзывах отмечено, что в ходе диссертационного исследования была разработана и испытана в условиях диагностической лаборатории методика выявления оппортунистического патогена крупного рогатого скота *U. diversum*, а также показана целесообразность контроля за распространением данного патогена среди поголовья крупного рогатого скота и идентификация случаев заболеваний, ассоциированных с ним. Выявлено широкое распространение носительства *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации (>50% взрослых животных являются носителями *U. diversum*). Носительство *U. diversum* ведёт к статистически значимому снижению способности к оплодотворению среди взрослых животных младшего возраста (нетель).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом в области разработки методов диагностики заболеваний сельскохозяйственных животных и заболеваний, ассоциированных с микоплазмами.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана новая методика выявления *U. diversum*, позволяющая повысить аналитическую чувствительность и специфичность исследования биологического и патологического материала от крупного рогатого скота на предмет присутствия уреаплазм данного вида. Предложена комбинация ДНК-мишеней, которая позволяет одновременно с выявлением ДНК *U. diversum* проводить оценку качества препарата ДНК, с целью снижения числа ложноотрицательного результата, связанного с деградацией ДНК при транспортировке и хранении материала. Доказана высокая эффективность реакции амплификации ПЦР с использованием разработанной автором смеси, которая составляет 98% и высокая аналитическая чувствительность реакции, достигающая 10 геномных эквивалентов на аликвоту исследуемого препарата ДНК. Введены новые представления о распространённости *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого, содержащегося на животноводческих предприятиях Северо-западного федерального округа Российской Федерации, превышающей 80% в отдельных возрастных группах.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказано негативное влияние *U. diversum* на репродуктивные характеристики крупного рогатого скота, выражающиеся в снижении способности к оплодотворению у животных младшего возраста. Применительно к проблематике диссертации, результативно использован комплекс существующих методов исследования, в том числе бактериологических методов выявления возбудителей заболевания и методов молекулярно-биологического исследования, таких как

ПЦР в реальном времени, которые позволили наработать доказательную базу для предложений по организации обследования поголовья крупного рогатого скота на предмет носительства *U. diversum* и обоснования применения разработанной методики для этой цели. Изложены факты, указывающие на целесообразность проведения исследований, направленных на выявления *U. diversum* при бронхопневмониях молодняка крупного рогатого скота и снижении репродуктивных качеств взрослого крупного рогатого скота. Раскрыты новые закономерности распределения частоты бессимптомного носительства *U. diversum* среди различных возрастных групп крупного рогатого скота. Изучены возможности применения разработанной методики для исследования различных типов биологического и патологического материала при обследовании различных возрастных групп крупного рогатого скота на предмет носительства *U. diversum*. Проведена модернизация молекулярно-биологических методов выявления *U. diversum*, заключающаяся в выборе новых генетических мишеней для видоспецифической индикации данного оппортунистического патогена.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанный автором метод выявления *U. diversum* был внедрён при обследовании крупного рогатого скота на животноводческом комплексе, принадлежащем ОАО "Партизан", по результатам чего были проведены мероприятия по антибиотикопрофилактике бронхопневмоний молодняка крупного рогатого скота, повысившие его сохранность на 10%. Определены возможности применения молекулярно-биологических методов при выявлении бессимптомного носительства *U. diversum* и лабораторной диагностике заболеваний, ассоциированных с данными уреаплазмами. Создана диагностическая система, прошедшая комиссионные испытания в производственных условиях и соответствующая требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам (НД №13-5-2/1062 "Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы" (утв. Минсельхозпродом России 17.10.1997)), что подтверждено декларацией соответствия, выданной ФГБУ "Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" (регистрационный номер декларации: РОСС RU Д-RU.CC07.B.00018/18/врРФ(ЕП).CC07.00021/18). Представлен алгоритм обследования животных различных возрастных групп при подозрении на распространение среди поголовья случаев заболеваний, ассоциированных с *U. diversum*, и снижении репродуктивных показателей у животных.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальная работа выполнена на высоком методическом уровне, с использованием бактериологических и современных молекулярно-биологических методов. Исследовано 230 образцов биологического материала, отобранного с поверхности слизистых оболочек респираторной и репродуктивной систем разновозрастного крупного рогатого скота, а также патологический материал, собранный при вскрытии погибших 8 животных. Теория исследования построена на известных, проверяемых данных и согласуется с литературными данными по распространению *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота, а также применению молекулярно-биологических методов при лабораторной диагностике заболеваний, ассоциированных с данным патогеном, и выявлении случаев бессимптомного его

носительства. Идея базируется на обобщении мирового опыта по контролю за заболеваниями, вызываемыми уреоплазмами различных видов. Использовано сравнение авторских данных с данными, полученными по распространению *U. diversum* среди поголовья крупного рогатого скота и связанным с ней заболеваниями в различных странах мира. Установлено, что полученные показатели распространения *U. diversum* среди взрослого крупного рогатого скота находятся на высоком уровне, превышающем 50% поголовья, что, согласно авторским данным, может объясняться особенностями возрастной структуры поголовья и фазовостью течения инфекционного процесса. Использованы сертифицированные методы исследования, общепринятые подходы к описательной статистике и компьютерные программы, базы данных, имеющиеся в свободном доступе.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении всех микробиологических и молекулярно-генетических исследований. Автором был самостоятельно разработан дизайн научного исследования, проведен аналитический обзор литературы. В ходе работы автором лично выбраны мишени для ПЦР в реальном времени в составе геномов *U. diversum* и *Bos taurus* (крупного рогатого скота), проведена оптимизация состава реакционной смеси, исследование биологического и патологического материала от животных, статистическая обработка полученных данных. Отбор биологического и патологического материала проводился совместно с с.н.с. лаборатории иммунохимических технологий 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, к.в.н. Борисенко С.В.; бактериологические исследования проводились совместно с с.н.с. лаборатории иммунохимических технологий 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, к.б.н. Рока В.В. Автор самостоятельно провел анализ полученных данных, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

На заседании 16 мая 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Вагановой А.Н. учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 5 докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 13 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, входящих в состав совета, проголосовали за - 17, против -1, недействительных бюллетеней нет.

Председатель диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

16.05.2019 г.



Алешкин Владимир Андрианович

Борисова Ольга Юрьевна