

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Сухинина Александра Александровича на диссертационную работу Абед Алхуссен Мохаммад «Молекулярно-биологические методы диагностики микоплазмозов крупного рогатого скота», представленную к защите в диссертационный совет 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

Актуальность темы

Представители рода *Mycoplasma* (класс *Mollicutes*) - это мелкие микроорганизмы, которые характеризуются отсутствием клеточной стенки, низким содержанием G-C и небольшим размером генома. Наиболее важными представителями класса *Mollicutes*, поражающими КРС, являются *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* и *M. dispar*. Они вызывают множество заболеваний, наиболее значимые из которых маститы, пневмонии, репродуктивные расстройства и артриты у телят и взрослых животных. Эти заболевания могут носить хронический характер, снижая резистентность КРС к другим вирусным и бактериальным патогенам. Смертность может достигать 10 %, заболеваемость - 35 %. Микоплазменные инфекции негативно влияют на экономическую производительность ферм. Из-за хронической природы микоплазменных заболеваний и наличия субклинических форм выявление инфекции может быть затруднено. Резистентность микоплазм к большому числу противомикробных препаратов затрудняет антибиотикотерапию настолько, что для некоторых заболеваний, например, мастита, в настоящее время рекомендуется убой всех пораженных животных. Сложности лечения микоплазмозов обуславливают актуальность профилактики этих заболеваний. Разработка микоплазменной вакцины - сложная задача, и пока такие вакцины в качестве инструмента для контроля микоплазменных инфекций КРС рассматривать нельзя. Тем не менее, чтобы полностью понять механизм распространения микоплазм, необходимы дополнительные исследования и разработка эффективных программ контроля микоплазмозов.

Классическим способом идентификации микоплазм КРС является выделение чистой культуры на жидких и плотных питательных средах, что имеет приоритетное значение, так как в этом случае можно получить наиболее полную информацию о культурально-морфологических и биологических свойствах возбудителя. Кроме того, у данного метода имеется дополнительное преимущество, заключающееся в возможности создания банка клинических изолятов, которые в дальнейшем возможно использовать для разработки и совершенствования стратегий профилактики, контроля и искоренения микоплазмозов, а также выявления резистентности микоплазм к антибактериальным препаратам. В современных условиях оперативность

диагностики может быть достигнута за счет ПЦР в режиме реального времени, которая обеспечивает быструю и точную идентификацию генома микоплазм в пробах биологического материала.

На территории РФ комплексная и систематическая лабораторная диагностика микоплазмозов КРС не проводится и в отечественной литературе отсутствуют актуальные данные о распространении *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar* на территории РФ.

Учитывая вышеизложенное, усовершенствование отечественных методов выявления *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* в пробах патологического материала, а также оптимизация компонентов питательных сред для культивирования *M. bovis* (выделение на питательных средах) и изучение полученных изолятов *M. bovis* является, несомненно, актуальной целью данной работы и определяющей значимость проведенных исследований.

Научная новизна и практическая значимость работы

Научная новизна диссертационного исследования Абед Алхуссен Мохаммад определяется разработкой и внедрением в лабораторную практику диагностических тест-систем на основе ПЦР и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для выявления ДНК *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. mycoides subsp. Mycoides SC* КРС с последующим выделением полевого изолята «Калуга 2020» *M. bovis* на жидкой и плотной питательных средах.

Безусловными признаками новизны являются представленные в диссертационной работе результаты изучения культуральных свойств и определения оптимального состава питательной среды для культивирования изолята «Калуга 2020» *M. Bovis*, изучения антимикробной резистентности изолята *M. bovis* «Калуга 2020» и определения его генетической характеристики.

Разработан метод полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле для выявления ДНК *M. dispar* в пробах биологического материала КРС.

В результате проведенных исследований получены новые научные данные и показана широкая выявляемость ДНК возбудителей *M. bovis*, *M. bovis genitalium* и *M. dispar* в животноводческих хозяйствах на территории Российской Федерации.

Практическая значимость работы, выполненной Абед Алхуссен М., не вызывает сомнений, поскольку ее результаты легли в основу ряда нормативных документов:

- «Методические рекомендации по выявлению ДНК патогенной *Mycoplasma bovis* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени»;

- «Методические рекомендации по выделению *Mycoplasma bovis* на жидких и твердых питательных средах»;

- «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma dispar* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле»;

- «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC (Mmm SC) с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени»;

- «Методические рекомендации по выявлению ДНК *Mycoplasma bovis genitalium* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени».

Полученные диссертантом результаты послужили основой для разработки и валидации:

- тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *M. bovis* и *M. bovis genitalium* в пробах биологического материала КРС;

- ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле для выявления ДНК *M. dispar* в пробах биологического материала КРС;

- ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC в пробах биологического материала КРС.

Оценка содержания диссертации и её оформления

Структура и объем диссертации полностью соответствуют требованиям ВАК РФ. Диссертация изложена на 194 страницах компьютерного текста, содержит разделы: обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение. Список использованной литературы включает 282 источника. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 36 таблицами. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность темы диссертации, обозначаются цель и задачи, научная новизна, определяется теоретическая и практическая значимость работы и основные положения диссертации, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из разделов, содержащих информацию: о распространении микоплазм, их характеристике и особенностях; о клинических признаках микоплазмозов, особенностях патогенеза и молекулярного механизма; о существующих методах лабораторной диагностики.

В разделе «Материалы и методы» приводятся бактериальные и вирусные патогены; характеристики биоматериала, питательных сред, растворов, реактивов, оборудования и методов анализа. Автором диссертации проведены исследования с применением материалов, методов и оборудования соответствующих современному уровню лабораторной диагностики.

В разделе «Результаты собственных исследований» представлены полученные результаты по разработке: методики выявления ДНК *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis genitalium* и *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SC* с помощью ПЦР-РВ; методики выявления ДНК *Mycoplasma dispar* в ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле; методики выделения полевых изолятов *M. bovis* на жидких и плотных питательных средах. Представлены данные по выявлению ДНК микоплазм в пробах биологического материала; определению фаз роста и времени максимального накопления изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в модифицированной среде Хейфлика; определению оптимального состава питательной среды для культивирования изолята «Калуга 2020» *M. Bovis*; антимикробной резистентности данного изолята и его генетической характеристики.

В разделе «Заключение» Абед Алхуссен М. лаконично обобщает результаты работы, формулирует выводы и практические предложения, которые полностью соответствуют поставленным задачам и отражают результаты проведенных исследований.

Степень достоверности и апробации результатов

Диссертационная работа выполнена в ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в период с 2018 по 2022 гг. в рамках тематики НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ» "Разработка комплексной системы контроля инфекционных болезней животных и совершенствование методов исследования остатков запрещенных и вредных веществ в организме животных, кормах и продуктах животного происхождения" («Ветеринарное благополучие»).

Автором диссертации проведены исследования с применением материалов, методов и оборудования соответствующих современному уровню лабораторной диагностики.

В диссертации использован большой объем экспериментального материала. Результаты проведенных исследований достоверны, что подтверждается комиссионными испытаниями разработанных и утвержденных методических рекомендаций, используемых для выявления ДНК *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. dispar* и *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC* в пробах патологического материала КРС с помощью ПЦР и ПЦР-РВ и для выделения *M. bovis* на жидких и плотных питательных средах.

Завершающие диссертацию выводы и практические предложения сформулированы на основе анализа современных литературных данных и результатов собственных исследований, их достоверность не вызывает сомнений.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях методической комиссии и Учёного совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период с 2018 по 2022 гг. Результаты исследований были представлены для

обсуждения научной общественности в 6 научных работах, из них: 3 - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 3 - в материалах отечественных международных конференций.

Все задачи, поставленные автором в рамках данной диссертационной работы, полностью решены. Диссертантом успешно достигнута поставленная цель. Справедливость сделанных выводов подтверждена статистической обработкой полученных автором результатов экспериментальных исследований.

В диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материала. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Представленная работа, безусловно, полезна в научном и практическом плане и направлена на решение актуальных проблем отрасли.

Всё выше изложенное позволяет дать работе положительную оценку. Вместе с тем, по работе имеются некоторые **замечания и дискуссионные моменты**:

1. Почему вместо анализа полной геномной последовательности микоплазмы используется только набор коровьих генов?

2. Возможно ли использовать разработанные методики ПЦР-РВ для детекции ДНК *M.bovis* и *M.bovisgenitelum* в формате мультиплекс для экономии времени на диагностику?

3. С чем связан низкий процент выделения микоплазм на питательных средах при наличии положительных результатов ПЦР-РВ?

4. В тексте встречаются неудачные выражения.

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки работы, несомненно, содержащей научную новизну и представляющей собой целостное исследование.

Заключение

Диссертационная работа Абед Алхуссен Мохаммада выполнена на современном научно-методическом уровне и представляет собой самостоятельно выполненную, научно-квалификационную работу, в которой содержатся новые научные данные по диагностике, распространению и филогении микоплазмозов крупного рогатого скота, имеющие существенное научное и практическое значение для развития ветеринарной отрасли.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, обоснованные выводы, свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов, объему выполненных исследований и оформлению диссертационная работа «Молекулярно-биологические методы диагностики микоплазмозов крупного рогатого скота», отвечает требованиям

раздела II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. за № 842 с изм., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Абед Алхуссен Мохаммад, заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных».

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
университет ветеринарной медицины»,
доктор биологических наук,
профессор
09.06.2023 года


Сухинин Александр Александрович

Подпись профессора Сухинина А.А. заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО СПбГУВМ,
доктор ветеринарных наук


Гаврилова Надежда Алексеевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

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

Телефон: +7 (812) 388 36 31, адрес электронной почты: secretary@spbguvm.ru