

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Орловой Светланы Тихоновны «Усовершенствование методов обнаружения микоплазм у собак и кошек», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Большой объем теоретических и экспериментальных данных, полученных в последнее время в отношении представителей класса Mollicutes, значительно расширил наши представления о мельчайших тахителичных прокариотах, способных к самостоятельному воспроизведению. Однако механизмы высокой адаптивности этих бактерий к условиям внешней среды, перехода от комменсалов в патогены, преодоления иммунного контроля высших организмов и персистенции пока не вполне ясны. Очевидно, что необходимы всесторонние комплексные исследования этих бактерий, основанные как на классических микробиологических, так и современных физико-химических методах высокого разрешения с использованием омикс технологий и вариантов микроскопии. Проведение таких исследований в значительной мере сдерживаются трудностями культивирования микоплазм на искусственных питательных средах. В мире сегодня мало лабораторий, имеющих возможности культивировать микоплазмы, выделять клинические изоляты и получать аксеничные культуры микоплазм. Это осложняет проведение не только фундаментальных исследований, но и практических разработок контроля этих бактерий, связанных в том числе с определением чувствительности микоплазм к антимикробным препаратам, необходимого для эффективного подавления микоплазменных инфекций, а также мониторингом распространения антибиотикорезистентных и патогенных штаммов. Несмотря на ограниченные метаболические возможности, микоплазмы широко распространены в природе – они могут инфицировать человека, животных, растения и являются основными контаминантами клеточных культур и вакцинных препаратов. Многие из них признаны комменсалами, но некоторые могут быть или становиться патогенными. При этом один и тот же вид микоплазм может инфицировать и вызывать заболевания и у человека, и у животных. У животных микоплазмы наиболее часто являются возбудителями заболеваний респираторного и репродуктивного трактов, мастита, артрита и кератоконъюнктивита. Традиционные способы выявления бактерий (микробиологический, основанный на высеве бактерий на бесклеточные питательные среды, и серологический, связанный с выявлением специфичных антител) в случае микоплазменных инфекций оказываются ненадежными из-за особенностей биологии микоплазм. Ограниченные биосинтетические возможности микоплазм требуют

культуральных сред очень сложного состава. При этом особенности состава сред определяют возможность контаминации культуры микоплазмы другими бактериями, в том числе другими видами/штаммами микоплазм. Сложившаяся ситуация диктует необходимость как оптимизации культуральных сред для выращивания микоплазм, так и дополнительного диагностического контроля этих бактерий.

В 1983 году была предложена среда для выделения и идентификации микоплазм с конъюнктивы, из респираторного и урогенитального трактов собак и кошек. Метод выделения и идентификации микоплазм с помощью этой среды имеет ряд недостатков, заключающихся в невозможности стандартизации питательного состава, сложности учёта результатов из-за отсутствия свойственного только микоплазмам характера роста, использование большого количества посевов для каждого образца, необходимость многократных пересевов. При этом часто остаются неучтенными минорные виды, вытесняемые при многократном пассировании другими видами микоплазм. Кроме того, многие микоплазмы плохо растут на бесклеточных средах, а некоторые вообще не удается вырастить *in vitro*. Все это определяет необходимость обязательного дополнения метода культивирования другими способами детекции микоплазм. Эффективным способом выявления бактерий (в том числе микоплазм) в любом биологическом материале сегодня считается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий с помощью молекулярных зондов – праймеров на нуклеотидные последовательности (ДНК/РНК), являющиеся филогенетическими маркерами, определять вид бактерии, а также контролировать рост клеток микоплазм на бесклеточных средах. В этой связи диссертация Орловой С. Т., посвященная усовершенствованию методов обнаружения микоплазм у кошек и собак, направленная на разработку комплексного метода выявления микоплазм в образцах биоматериала от собак и кошек путем сочетания бактериологических и молекулярно-генетических методов, представляется весьма важной и своевременной работой.

Автору удалось достичь поставленной цели. Применение классического микробиологического метода и молекулярно-генетического способа, основанного на использовании ПЦР, позволило диссертанту усовершенствовать микробиологический способ обнаружения микоплазм у собак и кошек, и разработать комплексный метод выявления микоплазм, объединяющий бактериологический посев и ПЦР-анализ, что является актуальной задачей ветеринарной инфектологии.

Для достижения поставленной цели (*разработка комплексного метода выявления микоплазм в образцах биоматериала от собак и кошек путём сочетания бактериологических и молекулярно-генетических методов*) автором решались следующие

задачи: 1) упростить методику культивирования микоплазм собак и кошек с целью снижения трудоемкости при сохранении приемлемой чувствительности. Для этого стандартизировать состав нескольких вариантов среды и подобрать их оптимальную комбинацию, пригодную для роста большинства видов микоплазм. Выбрать более современные антибиотики для повышения селективности методики; 2) дополнить полученную методику культивирования избирательным ПЦР-анализом для подтверждения наличия или отсутствия роста микоплазм на разных вариантах среды в сомнительных случаях; 3) провести сравнительную оценку чувствительности и специфичности раздельного использования культивирования и ПЦР-анализа и их совместного применения в виде комплексного метода; 4) оптимизировать этапы культуральных работ с микоплазмами – пробоотбор, клонирование, идентификацию клонов, адаптацию выделенных изолятов и клонов путем пассирования и их хранение; 5) провести выборочную видовую идентификацию выделенных из полевого материала микоплазм с использованием молекулярно-генетических методов для формирования их базовой коллекции.

Все задачи были успешно решены, о чем свидетельствуют рукописное изложение диссертации, выводы и опубликованные автором работы. В результате решения поставленных задач С.Т. Орловой стандартизирован состав 9 вариантов среды, удовлетворяющих энергетические потребности различных родов и видов микоплазм, выделенных от собак и кошек. Для культивирования микоплазм предложена методика с использованием комбинации из 5 вариантов среды, что сокращает трудоемкость лабораторных микробиологических исследований по выявлению микоплазм в образцах биоматериала. Установлено, что «подращивание» микоплазм перед проведением посева в среде для взятия образцов биоматериала, содержащей современные бактерицидные антибиотики амоксиклав и/или цефепим, повышает селективность методики. Диссертантом впервые предложен способ деконтаминации культур микоплазм в процессе клонирования. В результате использования метода ПЦР автором установлено, что однократное клонирование достаточно для разделения микоплазм разных видов и их дальнейшей идентификации посредством секвенирования. На основании полученных данных автором выдвигается предположение, что рост «ферментирующих» и «неферментирующих» видов микоплазм определяется в большей степени рН культуральной среды, чем содержащейся в ней энергетической добавкой. В результате серии экспериментов автору удалось установить, что при хранении в условиях умеренно отрицательных температур (-18°C) часть жизнеспособных клеток микоплазм, выделенных от собак и кошек, сохраняется более 12 месяцев. Из респираторного тракта собак и кошек, а также из глаз кошек С.Т. Орлова

изолировала, клонировала, идентифицировала и частично охарактеризовала следующие виды микоплазм: *Mycoplasma arginini*, *M. canis*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. edwardii*, *M. maculosum*, *M. spumans*, *Ureaplasma felinum*. Эта уникальная коллекция изолятов, безусловно, представляет ценность для исследователей молекулярной и клеточной биологии микоплазм животных.

Получению значимых результатов способствовало применение автором комплексного подхода, основанного на использовании современных молекулярно-биологических методов (ПЦР-анализ и секвенирование полученных ампликонов по Сэнгеру) и классического микробиологического метода. В соответствующей главе диссертации (Материалы и методы исследований) четко и подробно изложены составы всех используемых в работе сред, способы выделения, культивирования, клонирования и хранения клеток микоплазм, а также процесс анализа биологического материала с помощью ПЦР.

Диссертация С.Т. Орловой написана в традиционном стиле и состоит из введения, включающего изложение актуальности, цели и задач исследования, а также новизну и практическую значимость работы, обзора литературы, описания собственных результатов (в эту главу включены разделы «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов»), заключения (в котором приведены выводы), списка сокращений, списка использованной литературы и приложения. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и содержит 19 рисунков и 12 таблиц. Список цитируемой литературы включает 246 источников, из них 223 иностранных авторов.

Глава «Обзор литературы» содержит анализ научных работ, касающихся общей характеристики представителей класса Mollicutes, описания микоплазменных инфекций у кошек и собак, лечения микоплазмозов этих животных, а также особенностей культивирования и типирования чистых культур микоплазм. Приведенные в этом разделе сведения достаточны для понимания актуальности темы исследования автора, а также места и значимости полученных диссертантом результатов в отношении усовершенствования методов обнаружения микоплазм у собак и кошек. В разделе учтены актуальные современные работы. Однако жаль, что работа Gautier-Bouchardon 2018 (*Microbiol Spectr.* doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018) не процитирована диссертантом – этот обзор посвящен не только уникальности природы и антибиотикоустойчивости микоплазм, но и проблемам, связанным с культивированием микоплазм животных на бесклеточных средах, и актуальности оптимизации соответствующего процесса.

Раздел «Собственные исследования» посвящен как использованным автором методам проведения экспериментов, так и полученным результатам, а также их анализу с точки зрения имеющихся сегодня представлений о природе микоплазм и способах их культивирования. Диссертантом подробно описаны и всесторонне проанализированы полученные экспериментальные данные, связанные с оптимизацией и стандартизацией состава культуральных сред, подбором эффективной схемы посева патологического материала, клонированием и молекулярно-генетическим типированием микоплазм, выделенным от собак и кошек, а также определением оптимального места взятия проб у кошек и собак. Результаты исследований проиллюстрированы необходимыми рисунками и таблицами. Четкость изложения, аккуратность в представлении первичных данных, сопоставимость результатов, полученных микробиологическими и молекулярно-генетическими методами, проведение экспериментов на большом количестве животных и статистическая обработка данных не оставляют сомнений в достоверности полученных диссертантом результатов и обоснованности выводов.

В целом диссертационная работа оставляет очень благоприятное впечатление. В ней, безусловно, присутствует новизна, теоретическая и практическая значимость, большой прикладной потенциал. На основании результатов исследований автора разработаны и утверждены Научно-методическим советом при ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина» методические рекомендации «Пробоотбор и культивирование микоплазм, обитающих на конъюнктиве и слизистых оболочках верхнего респираторного тракта собак и кошек. Сравнительный анализ чувствительности бактериологического метода и метода ПЦР». Подана заявка на патент РФ «Набор сред для визуального выявления представителей класса Mollicutes в образцах с конъюнктивы и из респираторного тракта собак и кошек, способ изоляции и культивирования микоплазм, ахлеплазм и уреоплазм от собак и кошек» (номер заявки 2019110925, дата поступления 11.04.2019). Результаты диссертанта используются при проведении занятий по дисциплинам «микробиология», «эпизоотология и инфекционные болезни», а также в рамках программ повышения квалификации ветеринарных специалистов (справка о внедрении результатов прилагается к диссертации в разделе «Приложение»).

Результаты, полученные автором в процессе выполнения диссертации, опубликованы в 8 печатных изданиях, из них 7 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Диссертация очень аккуратно оформлена и ясно изложена, грамматические и стилистические погрешности минимальны. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации. Основные результаты работы достаточно отражены в автореферате диссертации и в публикациях автора.

Замечаний принципиального характера к диссертационной работе Орловой С.Т. нет. Вместе с тем, есть ряд моментов, которые необходимо прояснить.

1. Согласно данным таблицы 6, в образцах с конъюнктивы больных кошек микоплазмы обнаруживались, а с конъюнктивы собак нет. С чем может быть это связано?
2. Метаболические отличия кошек в отношении синтеза таурина в значительной мере определяют восприимчивость этих животных к инфекционным заболеваниям вообще и заболеваниям глаз в особенности при недостаточном поступлении таурина с кормом. Есть ли в литературе сообщения о проведении соответствующих исследований в случае микоплазменных инфекций у кошек, и есть ли у Вас информация относительно включения таурина в качестве добавки в корм кошек, пробы которых исследовались в Вашей работе?
3. На странице 110 приводятся данные по сравнению чувствительности микробиологического метода и ПЦР-анализа, но не указывается важнейший аспект метода ПЦР – возможность выявлять в биологическом материале некультивируемые формы бактерий, дормантные формы, определяющие толерантность бактерий к стрессорам, в том числе антимикробным препаратам, и персистенцию.
4. При описании использованных методов ПЦР и сиквенса отсутствует информация относительно контролей на «kitome».
5. В выводе 5 сообщается о частичной биохимической характеристике идентифицированных микоплазм, но в тексте диссертации эти характеристики не резюмируются.
6. Согласно полученным экспериментальным данным, *A.laidalwii* – «убиквитарная» микоплазма, весьма распространенная у животных, не обнаружена в образцах больных кошек и собак. С чем может быть это связано? Установлено, что специфическая ассоциация белка с нуклеотидной последовательностью спейсера 16S-23S рДНК у наноформ *A.laidalwii* подавляет амплификацию этого участка, так что выявление *A.laidalwii* с помощью рутинного экспресс-анализа ПЦР, основанного на использовании соответствующих праймеров, может быть неэффективным, поэтому для детекции *A.laidalwii* с помощью ПЦР необходимо проводить дополнительную депротенизацию ДНК. Учитывалось ли это в Вашей работе?

Указанные замечания и вопросы не влияют на общую высокую положительную оценку работы. Диссертация С.Т. Орловой является оригинальной, целостной, завершенной

работой, в которой представлены исследования по усовершенствованию методов обнаружения микоплазм у собак и кошек.

Заключение

Учитывая актуальность выполненного исследования, новизну полученных данных, их теоретическое и практическое значение для фундаментальной и прикладной ветеринарной микробиологии, считаю, что диссертационная работа Орловой Светланы Тихоновны «Усовершенствование методов обнаружения микоплазм у собак и кошек», выполненная под руководством доктора ветеринарных наук, профессора Сидорчука Александра Андреевича, является законченным научно-квалификационным исследованием. Полученные автором данные вносят существенный вклад в совершенствование метода выделения и идентификации микоплазм у кошек и собак.

Считаю, что диссертационная работа С.Т. Орловой соответствует всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Орлова Светлана Тихоновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Руководитель Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр» Российской академии наук», доктор биологических наук, профессор

Чернов В.М.
12 марта 2020 г.

Адрес: 420111, Российская Федерация, Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр» Российской академии наук», тел. +7(843) 292-75-97, Email:presidium@knc.ru

Подпись д.б.н. Чернова В.М. заверяю
Главный ученый секретарь ФИЦ КазНЦ РАН,
Кандидат химических наук
Зиганшина Суфия Асхатовна

