



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру. Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.
Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Орловой Светланы Тихоновны** «Усовершенствование методов обнаружения микоплазм у собак и кошек» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, представленной в Диссертационный совет Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН»).

Актуальность избранной темы не вызывает сомнений. Являясь мембранными паразитами, микоплазмы сильно отличаются по вирулентным свойствам: многие из них являются комменсалами, а некоторые вызывают такие опасные заболевания, как контагиозную плевропневмонию КРС, инфекционную агалактию МРС и др. При этом некоторые виды молликут могут инициировать активный инфекционный процесс только в условиях воздействия на организм стрессовых факторов. При всем многообразии изученных возбудителей микоплазменных инфекций до сих пор имеются нерешенные вопросы в их диагностике, а сложность и трудоемкость культивирования микоплазм является основной причиной ограниченного использования бактериологического метода. Поэтому совершенствование методик выделения микоплазм, изыскание новых моделей для их изоляции с последующей идентификацией вида является весьма актуальной задачей.

Целью исследований диссертанта стала разработка комплексного метода выявления микоплазм в образцах биоматериала от собак и кошек путём сочетания бактериологических и молекулярно-генетических методов.

Научная новизна и практическая значимость работы заключается в разработке эффективной методики по изоляции микоплазм разных видов, способа деконтаминации культур в процессе клонирования, оптимизации селективной среды для взятия биоматериала. Получены новые данные в области микоплазмологии, а именно влияния рН на рост ферментирующих и неферментирующих видов микоплазм и умеренно отрицательных температур на сроки хранения изолятов. Из слизистых респираторного тракта и конъюнктивы собак и кошек автором изолированы и идентифицированы *Mycoplasma arginini*, *M. canis*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. edwardii*, *M. maculosum*, *M. spumans*, *Ureaplasma felinum*, которые могут быть использованы для дальнейших научно-исследовательских работ. Ведется работа по поддержанию данной коллекции.

На основании результатов исследований разработаны и утверждены 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 на изобретение «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 уреаплазм от собак и кошек» (номер заявки 2019110925, дата поступления 11.04.2019). Результаты используются при проведении занятий по дисциплинам «микробиология», «эпизоотология и инфекционные болезни», а также в рамках программ повышения квалификации ветеринарных специалистов, что говорит о значимости результатов, полученных в рамках

научно-исследовательских работ при написании диссертационной работы и возможности применения этих результатов в практической микробиологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Выводы, рекомендации и научные положения в материалах диссертационной работы подтверждены результатами собственных исследований и обоснованы. Выводы, вытекающие из результатов исследований, являются глубоко проанализированными и аргументированными. По теме диссертации опубликовано 8 научных статей, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ; изданы 1 методические рекомендации; подана 1 заявка на патент РФ на изобретение. Результаты исследований апробированы на семинаре «Визуальная диагностика и терапия мелких домашних животных» и в рамках курса лекций «Общая терапия МДЖ» (Клиника экспериментальной терапии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ имени Н.Н. Блохина» РАМН, Ветеринарная клиника ООО «Биоконтроль»; Москва, 2012 и 2016 гг.); на международной учебно-методической и научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», посвященной 100-летию со дня основания ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина» (Москва, 2019 г.).

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждена статистической обработкой данных, эксперименты проведены на достаточном количестве животных, результаты исследований подтверждались несколькими методами и продемонстрировали сопоставимость значений, а разработанные подходы в настоящее время применяются в исследованиях биологического материала на наличие микоплазм и при выполнении НИР в ФГБУ «ВГНКИ».

Оценка содержания работы. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, состоит из традиционных разделов, иллюстрирована

12 таблицами и 19 рисунками. Список литературы содержит 246 источников, в том числе 223 работы иностранных авторов.

В обзоре литературы автор дает детальную характеристику молликутам, их таксономии, раскрывает проблематику их роли в патогенезе клинических форм микоплазмоза и ассоциированных инфекций. Автор указывает на сложность типирования микоплазм и определения их роли в качестве первичного или вторичного патогена. Большое внимание в обзоре уделено микоплазмам собак и кошек, проблемам их диагностики и лечения.

В разделе «Собственные исследования» диссертант подробно описывает методологию проведенных исследований – от пробоотбора и культивирования на сложных питательных средах до молекулярно-биологической идентификации.

Пробы для микоплазмологических исследований были отобраны от 138 собак и 62 кошек. Всего было происследовано 267 образцов, взятых со слизистых оболочек респираторного тракта и конъюнктивы.

Автором предложено несколько вариантов питательных сред для взятия проб с целью выделения разных видов микоплазм, отличающихся по культуральным и биохимическим свойствам. В работе были использованы жидкие, полужидкие и плотные среды с разными энергетическими добавками (глюкоза, аргинин, мочевины) и значениями pH. Для выделения уреоплазм применялись исключительно жидкие среды с мочевиной. В качестве бактериостатического компонента в составе питательных сред исследовались комбинированный антибиотик - амоксиклав и препарат из цефалоспоринового ряда - цефепим в разных комбинациях. Необходимость замены бензилпенициллина была связана с приобретенной антибиотикорезистентностью вторичной микрофлоры, которая часто присутствует в первичном образце для выделения микоплазм. В процессе экспериментальной работы подобраны оптимальные анатомические места у собак и кошек для взятия образцов на микоплазмологическое исследование,

разработана схема посева проб на набор сред, включающих 5 посевных единиц, что в несколько раз сокращает трудоемкость процесса выделения патогенов из биологического материала. Установлено, что рН культуральной среды оказывает ключевое влияние на рост ферментирующих или неферментирующих микоплазм. Оптимизирована методология всех этапов культуральных работ с микоплазмами – от пробоотбора до получения чистых культур и их поддержания в процессе хранения. Разработан способ деконтаминации культур от устойчивой к пенициллину микрофлоре в процессе их клонирования с использованием фильтрации и бактерицидных антибиотиков. Получены новые данные о возможности хранения изолятов и клонов микоплазм при температуре -18°C.

Оценивая диссертационную работу в целом, хочется отметить, что автором последовательно и грамотно спланированы этапы научно-исследовательской работы, один экспериментальный этап лаконично вытекает из другого, поставленная цель и задачи успешно решены. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

При анализе представленных для отзыва материалов возникли следующие **замечания и вопросы**:

1. В тексте диссертационной работы присутствуют, на наш взгляд, неудачные выражения, например, на стр. 45 в п. 3.1. указано, что «материал для исследований (мазки и смывы) собирали в ветеринарной клинике...», здесь лучше было бы применить слово «отбирали». На стр. 74 (2 абз.) написано, что «...на твёрдых средах микоплазмы растут менее охотно, чем на жидких...». На стр. 84 (1 абз.) написано «...при выявлении микоплазм в собачьих образцах».

2. На стр. 70 для результатов анализа ПЦР даны критерии, как «слабоположительный результат». Будет ли корректным для ПЦР такая интерпретация?

3. На стр. 66 указано, что было отобрано 10 образцов, которые засеяны в 105 пробирок и чашек Петри. Что в данном случае понимается под образцом, требуется пояснение, каким образом 1 образец был разделен на несколько частей?

4. Термин «посевная единица» и формула расчета ПЕ определены Вами или используются другими авторами в исследованиях, в частности в микоплазмологии?

5. На стр. 69 в таблице 5 видно, что при отрицательных результатах ПЦР в некоторых случаях в питательных средах визуализировался рост микроорганизмов в среде (изменение цвета индикатора, помутнение и пр.). Не пытались ли вы выяснить, рост каких бактерий присутствовал в среде с антибактериальными препаратами?

6. На стр. 99 отмечено интересное наблюдение о несоответствии ожидаемым результатам при пересеве культуры в две аналогичные пробирки с одинаковой средой (рост может присутствовать только в одной пробирке или в первой пробирке происходит закисление, а в другой – защелачивание среды). Как, по Вашему мнению, можно объяснить данное явление?

Изложенные незначительные замечания не умаляют научно-практической ценности представленной работы и не влияют на ее положительную оценку.

Заключение. Диссертационная работа Орловой Светланы Тихоновны «Усовершенствование методов обнаружения микоплазм у собак и кошек» является законченной научно-квалификационной работой с научным и прикладным значением в которой успешно решены поставленные задачи и достигнута актуальная для микоплазмологии и ветеринарной науки цель. Результаты исследований, новые штаммы возбудителей микоплазмозов, разработанные системы изоляции микоплазм могут использоваться в области микробиологии в ветеринарии. Тема диссертационной работы соответствует профилю диссертационного совета и паспорту специальности. По

актуальности, научной новизне и практической значимости, объему проведенных исследований, обоснованности положений и выводов диссертационная работа соответствует критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автор диссертационной работы, **Орлова Светлана Тихоновна**, заслуживает присуждения искомой степени **кандидата биологических наук** по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент,
кандидат ветеринарных наук,
заведующий лабораторией эпизоотологии
и мониторинга ФГБУ «Федеральный центр
охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»),
600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец,
ФГБУ «ВНИИЗЖ»
+79157694657, volkov_ms@arriah.ru

 М.С. Волков

Подпись Волкова М.С. заверяю
ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
доктор ветеринарных наук, профессор



В.С. Русалеев

Отзыв на 7 листах