

В ФГБНУ «Федеральный научный центр -  
Всероссийский научно - исследовательский институт  
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и  
Я.Р. Коваленко Российской академии наук»  
109428 г. Москва , ул. Рязанский проспект дом 24, к.1

### ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ОТЗЫВ

на автореферат диссертации, 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, представлена в диссертационный совет Д 006.033.02 при ФГБНУ "Федеральный научный центр - Всероссийский научно - исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р Коваленко Российской академии наук"

Оптимизация диагностики микоплазменной инфекции у собак и кошек весьма актуальна, поскольку у микоплазм, так же как и у других микроорганизмов, может проявляться антибиотикорезистентность, поэтому выделение и предварительное определение чувствительности микоплазм позволяет снизить количество рецидивов при повторном исследовании животных.

Диско-диффузионный метод не может быть использован для микоплазм, так как эти культуры растут очень медленно и получить зону ингибирования роста невозможно. В ветеринарной клинической практике в РФ для диагностики микоплазменной инфекции чаще всего используется метод ПЦР, имеющий, как справедливо указывает С.Т. Орлова, ряд ограничений.

Тема диссертации действительно актуальна, однако, об остальных характеристиках работы можно высказаться только отрицательно. Многочисленные замечания о нелепых ошибках, высказанные оппонентами и ведущей организацией, не в полной мере отражают методическое несовершенство диссертационной работы. Диссертация и автореферат должны быть написаны научным языком, грамотно и логично, цели, задачи, собственные исследования должны соответствовать выводам. Диссертация должна отражать профессиональные знания автора, а не перевод

иностранных источников с ошибками в ветеринарии.

В списке литературы 23 отечественных автора и 223 иностранных, как указывает С.Т. Орлова на стр. 10. В действительности — 21 отечественный источник, ошибочно включены 2 иностранных интернет-ресурса. Создается впечатление, что отечественные ученые вообще не занимались проблемой микоплазмоза, что является очевидной неправдой. По моему мнению, нет анализа нормативных документов РФ, отечественной литературы — нет и диссертации, ведь С.Т. Орлова работает в России.

Первый вопрос: в диссертации не применялись статистические методы исследования, их описание в соответствующих разделах отсутствует. Почему оппоненты не обратили на это внимание? Учитывая, что целью диссертации является «разработка комплексного метода выявления микоплазм в образцах биоматериала», без статистического анализа результатов исследований не обойтись.

Второй вопрос: оппонент М.С. Волков, заведующий лабораторией ФГБУ «ВНИИЗЖ» в замечании 2 задал вопрос об использованной С.Т. Орловой оценке ПЦР как «слабоположительная» см. стр. 80, 68 и др., при этом уважаемый оппонент полагает, что самовольные изменения инструкции при проведении реакции не препятствуют защите.

ПЦР на микоплазмоз с тест-системой «МИК-КОМ» была единственной и основной реакцией, от правильной интерпретации которой зависели выводы диссертации. Обратимся к инструкции к тест-системе «МИК-КОМ», утвержденной 10.09.2017 г.: «Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной ДНК. Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК: микроорганизмов рода *Mycoplasma* — 509 п.н. В образце обнаружена ДНК *Mycoplasma* spp., если в соответствующей ему дорожке присутствует полоса на уровне 509 п.н. большей или меньшей интенсивности. В образце не обнаружена ДНК *Mycoplasma* spp., если в соответствующей ему дорожке отсутствует полоса на уровне 509 п.н.». Слабоположительный результат реакции не предусмотрен, только положительный или отрицательный. Введя третью оценку реакции самостоятельно, С.Т. Орлова сделала фатальную методическую ошибку. Объяснения по этому нарушению С.Т. Орлова дает на стр. 68: «Такое разделение результатов культивирования и ПЦР на положительные (+) и слабоположительные (±) является немного субъективным, но было необходимо для сравнения этих методов и примерной оценки чувствительности и специфичности первой вариации методики».

Сравнение выявляемости микоплазменной инфекции культуральным

методом и ПЦР проводится методом оценки доверительных интервалов, а не так, как хочется С.Т. Орловой — инструкцию нарушить проще, чем установить STATISTICA 8 StatSoft, Inc. и научиться в ней работать.

На стр. 115 в выводе 5 указано: «частично биохимически охарактеризованы микоплазмы видов *Mycoplasma arginini*, *M. canis*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. edwardii*, *M. maculosum*, *M. spumans*, *Ureaplasma felinum*». В тексте диссертации биохимическая характеристика отсутствует, и в задачи исследования она не входит, таким образом, вывод 5 не соответствует содержанию диссертации.

В таблице 5 на стр 69 «Сопоставление результатов визуальной оценки наличия роста на различных вариантах среды пробного посева с результатами ПЦР - анализа культур», при положительной ПЦР «смывов», взятых у собак и кошек, получена отрицательная ПЦР выделенных от этого животного культур. При этом использовалась среда с селективным компонентом, разработанная С.Т. Орловой. Вопрос: что же выросло на этой среде?

С.Т. Орлова в диссертационном исследовании берет уже известные не одно десятилетие компоненты сред для выращивания микоплазм, в качестве селективной добавки использует применявшийся давно бензилпенициллин, амоксилав и цефепим и делает вывод, что «амоксилав и/или цефепим эффективно подавляет рост других бактерий». По какой-то причине автор не использует термин «селективный». Для оценки новой среды следует использовать свежевыделенные клинические изоляты, что и выполнено, и эталонные штаммы, которых в диссертационной работе нет. Сравнительную оценку эффективности выделения микоплазм проводят после того, как все свежевыделенные изоляты дадут положительную ПЦР. Обратимся к той же таблице 5: у здоровой кошки ПЦР смыва отрицательная, а посев из глаз положительный, при отрицательном ПЦР культуры, у здоровой собаки аналогично. Что же выросло на разработанных С.Т. Орловой средах?

В настоящее время селективные среды для выделения микоплазм у людей содержат не один, а 3 и более антибиотика и противогрибковые компоненты вследствие персистенции грибов рода *Candida*. В отличие от людей, у животных на слизистых обнаруживается *Malassezia spp*, что также требует добавления антибиотика. В разделе диссертации Материалы и методы антибиотики не указаны, но на стр. 96 в разделе 3.3 Обсуждение результатов мы узнаем, что использовался амфотерицин В.

Каким образом подбирался оптимальный состав среды по селективным компонентам? На основании чего было рассчитано 60 мг амоксиклава и 100 мг цефепима? Какая концентрация микоплазм в расчете КОЕ/мл использовалась при подборе ростовых компонентов?

В диссертации не указано личное участие автора в получении результатов.

Перейдем к вопросам, на некоторые из которых обратили внимание оппоненты и ведущая организация, однако, они не посчитали их принципиальными, хотя принципиальность поставленных вопросов очевидна.

1. Согласно информации о соискателе, С.Т. Орлова несколько лет проработала ветеринарным врачом ветклиники, на базе которой и сделана диссертация, а в настоящее время является преподавателем кафедры эпизоотологии и организации ветеринарного дела. Официальный оппонент М.С. Волков, единственный из оппонентов, профессионально нашедший значительные ошибки в работе, но не давший им надлежащую оценку, в замечании 4 задает вопрос о том, что же такое «посевная единица» – термин, введенный автором из растениеводства в микробиологию впервые и без каких-либо обоснований. Посевная единица, код по ОКЕИ: 6423, это 150 тыс всхожих семян растений, например, подсолнечника. Это изучают на первом курсе академии в курсе растениеводства. Возникает вопрос. Какое отношение имеет один мешок всхожих семян растений к диагностике микоплазмоза собак и кошек?

2. В продолжение сельскохозяйственной темы соискатель применяет термин «Осмотр посевов», только иногда используя кавычки, поскольку посевы осматривают на полях, грядках и т. д., см. стр. 69, 70, 71, 81, 82, 85. Вероятно, идет речь об исследовании колоний микоплазм?

3. Стр. 4, абз. 2 «...большинство болезней, которые вызывают микоплазмы, – факторно-инфекционные или просто факториальные.» Факториальные болезни не существуют. Факториал — математический термин из 7 класса средней школы, не так ли? Относится ли микоплазмоз собак и кошек к факторным болезням? Если да, то где ссылка на автора?

4. Стр. 4, абз. 3 «ПЦР-диагностика получила широкое применение в последние годы, однако она не позволяет оценить жизнеспособность микроба». Первая публикация по методу ПЦР появилась в ноябре 1985 года в журнале Science, можно сказать, только вчера.

5. Ведущая организация в отзыве указывает на недопустимость применения термина «твердые питательные среды» вместо «плотные питательные среды», не эвфемизм ли это? Полагаю, что да, эвфемизм. Раздел 2.2.2 имеет название «Проникновение микоплазм в нетрадиционные места у собак», аналогично раздел 2.3.2 тоже поведал нам о чем-то нетрадиционном.

6. На стр. 52 автор пишет: «Отбор мазков осуществляли, твердо проводя по слизистой оболочке зондом-тампоном, смоченным средой для взятия

образцов биоматериала собственного приготовления. «По отбору проб в ветеринарии существует не только ГОСТ, но и многочисленные инструкции, в которых четко описываются движения руки врача при взятии пробы и это отнюдь не «твердо проводя» — налицо нарушение методики отбора проб.

7. Один из основных терминов, впервые опубликованный С.Т. Орловой, — среда «твердая тройная ГАМ». Что обозначает аббревиатура ГАМ? О «твердости» я задала вопрос №5.

8. На стр. 45 указано, что отбирались мазки и смывы. Как проводился смыв у кошки? Что использовали в качестве жидкости, как собиралась жидкость? Где нормативные ссылки? Или исследовались только мазки и никаких смывов не было, и автор не видит различие между смывом и мазком?

9. Для практикующего ветеринарного врача и тем более преподавателя более чем странно незнание основных положений ветеринарного законодательства и ветеринарной лабораторной отчетности. Как я полагаю, введенный автором термин «посевная единица» служит не только для сокрытия истинных незначительных объемов работы. Автор применяет следующие термины: образец биоматериала, проба и не указывает в работе количество проведенных исследований. Мы понимаем, что рецензенты должны рассчитать это самостоятельно.

10. Итак, на стр. 45 указано: материал отобран у 138 собак, из них 120 здоровых и 18 больных; у 62 кошек, из них 26 здоровых и 36 больных. Зачем исследовались здоровые животные в таком количестве в диссертационном исследовании по микоплазмозу, лично мне неясно и хотелось бы узнать результаты анализа эпизоотологических данных. Далее автор пишет, что всего собрано 267 образцов, вероятно, биоматериала. Всего 200 голов, а биоматериалов 267? Отбирались материалы дважды, трижды, одновременно или в течение времени? И почему у одного животного взята одна проба/материал, а у другого две или несколько? Далее, на стр. 54 указано, что сформированы группы животных, но по какому принципу и главное зачем — неизвестно, ведь материал отбирался в течение нескольких лет, и собаки и кошки не являлись объектами исследования. Группу 1 составили 2 кошки (здоровая и больная) и 2 собаки (здоровая и больная), как указано, для проведения ПЦР и культурального исследования. Как автор собиралась статистически обработать результаты исследования в этой группе? Далее, если врач отобрал биоматериал в клинике, в лаборатории, в которой проведена работа, уже нет собак и кошек, и их не надо делить на группы, поскольку в лаборатории врач имеет дело с материалом, пробой и исследованиями — от одного до нескольких, поскольку из одной пробы можно провести много исследований. Следовательно, нет никакой

необходимости отказываться от общепринятой методики лабораторной отчетности выдумывать «посевную единицу».

11. Далее, на стр. 55 читаем: «Таким образом, при выборе оптимальной комбинации из разных вариантов питательной среды, проведенном на животных групп 1 и 2 на набор сред из 6-7 ПЕ (полный набор: жГ, жА, жМ, пГ, пА, а также тГ и тА либо тГАМ; рисунок 5А) были в общей сложности посеяны 13 образцов». Обращаю внимание в дополнение к п. 7: комбинацию вариантов среды автор тестирует на животных из групп 1 и 2? Это животные в лаборатории исследуются или все-таки пробы? Данную ошибку делают ветеринарные лечащие врачи, не работавшие в лаборатории, у которых основная единица - животное. Ветеринарный врач лаборатории ведет учет не животных, а проб и исследований, животных у него нет. Если работа действительно проведена автором самостоятельно в лаборатории, сделать подобную ошибку очень сложно, как сложно поместить собаку в эппендорф. На стр. 45, кстати, указана порода собак «далматинец», но далматинец — это мультфильм, порода — далматин.

12. Недостаточно как-то перевести текст с английского, нужно еще знать специальность. Все твердые среды, нижние, верхние респираторные тракты и прочие казусы перевода в диссертации — это калька с английского, в отечественной научной литературе используются другие термины. Например, стр. 24 «Положение дел в микоплазменной патологии урогенитального тракта и у человека, и у животных лучше всего описывается несколько претенциозным названием одной из публикаций: «Микоплазмы и бесплодие. Немного фактов, немного вымысла и масса неизвестного» [80]» Ссылка приводит к Ellington, J.E. Mycoplasma and infertility. A little fact, a little fiction and a lot of unknown / J.E. Ellington // АКС Gazette. - 1993. - No. 110. - P. 75-78. АКС Gazette — это ежемесячное издание Американского кеннел-клуба для владельцев и заводчиков собак. Вы считаете, что это и есть наилучшая публикация по микоплазменной инфекции? На стр. 22, 4 абз. появился отсутствующий в ветеринарии термин и отсутствующая патология «инфильтраты в виде гранулем», и так далее, и так далее.

13. Оформлять работу следует в соответствии с ГОСТ. Курсив нередко применен излишне, а курсив, подчеркивание и полужирный шрифт одновременно вряд ли допустим в диссертации.

14. Это лишь несколько замечаний по данной работе. Не буду здесь приводить полностью свои расчеты по исследованиям и все замечания, которые при необходимости будут дополнены.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация не соответствует Положению о присуждении ученых степеней, утвержденному Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 ввиду нарушения С.Т. Орловой п. 9, п. 10 Положения, поэтому данную работу признать научно-квалификационной нельзя, она проведена и написана на низком научно-методическом уровне, отсутствует статистический анализ полученных данных, нарушена инструкция в тест-системе «МИК-КОМ», вследствие чего проведена неверная оценка реакции, не указан личный вклад автора, отсутствует статистический анализ полученных данных. Таким образом выводы не имеют обоснования, экспериментальная часть не соответствует выводу 5, выводы в ряде подразделов вторичны, соискатель не владеет профессиональной терминологией, анализ нормативных документов и публикаций отечественных ученых не проведен.



кандидат биологических наук. И.А.Леонтьева

Диплом кандидата биологических наук БА 020188, выдан 27.07.1988 г., решением совета Самаркандского сельскохозяйственного института имени В.В.Куйбышева от 22.03.1988 г., нотариально заверенная копия диплома предоставлялась в заявлении по аттестационному делу 16-249

03.08.2020 г.