

## **Отзыв официального оппонента**

### **на диссертационную работу Насибуллина Ильдара Равильевича «Индикация и идентификация *Aeromonas hydrophila* с использованием биопрепарата на основе специфического бактериофага»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02- ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

#### **Актуальность темы выполненной работы**

Диссертационная работа И. Р. Насибуллина, представленная на защиту, посвящена изучению фундаментальных основ методов быстрой диагностики зоопатогенных бактерий рода *Aeromonas*, широко распространённых в биосфере и вызывающих экономически значимые заболевания животных и человека. Несмотря на давнюю историю изучения аэромонад и вызываемых ими патологий, характерные для этого вида бактерий внутривидовая схожесть, широкий полиморфизм клинических проявлений аэромоназов и другие особенности существенно затрудняют быструю индикацию и диагностику патогена *Aeromonas hydrophila*. Естественным решением вопроса является применение метода специфической фагодиагностики патогена, разработка диагностического препарата бактериофага после тщательной молекулярной характеристики вируса, и разработка схемы ускоренной индикации и идентификации бактерии.

Несмотря на явную прикладную направленность, исследования подобного плана закладывают научную основу для рационального применения бактериофагов в фармакологии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

Необходимо отметить, что бактериофаги как терапевтические и диагностические агенты имеют более продолжительную историю, чем антибиотики, однако именно в настоящее время это применение фаготерапии для лечения бактериальных инфекций стало более актуальным. В первую очередь это связано с резким ростом лекарственной резистентности у современных патогенных бактерий, а также с возможностью детального изучения биологии бактериофагов, в том числе и механизмов их взаимодействия с хозяевами.

В связи с этим изучение особенностей взаимодействия зоопатогенных аэромонад с их бактериофагами, проведённое на современном методическом уровне и включающее в себя штаммы из актуального эпидемиологического репертуара, представляется важной и актуальной задачей.

#### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов**

И. Р. Насибуллиным проведена значительная работа как по выделению новых штаммов бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*, так и по их всесторонней биологической характеристике. Им были изучены основные биологические и генетические свойства выделенных фагов. После мотивированного отбора бактериофага F43-УГСХА на его основе был сконструирован биопрепарат для индикации и идентификации *Aeromonas hydrophila*. Предложена оригинальная схема фаговой идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* из объектов ветеринарного надзора с применением созданного биопрепарата. Кроме этого, автором исследования была разработана и апробирована на объектах ветеринарного надзора схема с реакцией нарастания титра фага для индикации бактерий *Aeromonas hydrophila* с использованием созданного фагового биопрепарата.

Для повышения достоверности и валидируемости получаемых результатов автором диссертации было проведено полногеномное секвенирование бактериофага для определения наличия потенциальных генетических локусов патогенности, биоинформационный (протеомный) анализ данных секвенирования бактериофага F43-УГСХА. Для паспортизации полученного препарата было определено филогенетическое положение бактериофага F43-УГСХА. Для последующих работ по модификации препарата и поиску новых бактериофагов автором была разработана схема молекулярно-генетической индикации с использованием ПЦР на последовательности автономных генетических элементов *hly* в геномах бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*.

Теоретическая и практическая значимость работы может быть изложена в виде основных тезисов – автором был разработан и апробирован оригинальный биопрепарат с определенными биотехнологическими параметрами для ускоренной индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора. Разработанные в работе схемы фагоиндикации и фагодиагностики позволяют сократить время исследований и снизить экономические затраты.

Препарат был подвергнут комиссионным испытаниям - результаты проведенных в работе исследований биологических и генетических свойств бактериофага F43-УГСХА, методология применения фагового биопрепарата в идентификации *Aeromonas hydrophila* и схеме реакции нарастания титра фага, подтверждены актами комиссионных испытаний в ФГБОУ ВО УлГАУ им. П. А. Столыпина от 29.09.2020 года. По материалам диссертации разработана нормативно-техническая документация: «Методические рекомендации по изготовлению и контролю бактериофага F43-УГСХА», «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *Aeromonas hydrophila* методом реакции нарастания титра фага в объектах санитарного надзора», «Методические рекомендации по индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* из объектов внешней среды с помощью



биопрепарата F43-УГСХА» (протокол № 3 от 29.09.2020 года). Штаммы полученных бактериофагов вошли в музейную коллекцию вирусных и бактериальных штаммов кафедры МВЭиВСЭ УлГАУ и используются в научно-исследовательской работе кафедры.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедре микробиологии, эпизоотологии, вирусологии и ветеринарно-санитарной экспертизе ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета имени П. А. Столыпина.

Проведённая автором работа по первичному выделению объектов исследования, глубокому их исследованию современными методами и доведение работы до получения апробированного прототипа тест-системы позволяют утверждать, что работа обладает и необходимой для присуждения автору искомой степени научной новизной, и достаточной теоретической значимостью. Практическая значимость работы также является несомненной.

### **Анализ содержания диссертации**

Диссертация И. Р. Насибуллина построена по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы (251 источник) и 8 приложений. Материалы диссертации изложены на 176 листах текста и проиллюстрированы 34 рисунками и 23 таблицами. Автореферат диссертации полностью отражает её содержание.

В главе «Введение» автор даёт обоснование цели исследований, определяет задачи, актуальность проблемы, описывает научную новизну и практическую значимость полученных результатов.

В обзоре литературы очень подробно, с использованием современной литературы, приведены данные о биологии аэромонад и их бактериофагов, а также описаны различные особенности микробиологии и микробиологической диагностики группы *Aeromonas*. Целая глава диссертации посвящена описанию бактериофагов группы аэромонад, истории их исследования и перспективам применения бактериофагов на практике. В целом обзор написан доступным литературным языком, и может быть хорошим справочным материалом для специалистов, работающих в научной области, связанной с микробиологией аэромонад.

Глава «Материалы и методы исследования» диссертационной работы содержит полное изложение применённых в исследовании методов. Основная часть исследований выполнена с

использованием классических и современных методов микробиологии, молекулярной биологии и биоинформатики.

Результаты проведённых исследований и их обсуждение представлены в соответствующем разделе. Экспериментальные данные изложены подробно. Постановка экспериментов, необходимых для решения поставленных диссертантом задач, логически обоснована.

В главе «Заключение» автор суммирует полученные результаты и описывает перспективы дальнейших исследований, переходя к логичным выводам.

По результатам диссертационной работы сделано 9 выводов. Они грамотно сформулированы и полностью отражают основные научные достижения диссертанта, а также их научную и практическую значимость. Выводы соответствуют целям и задачам проведённого исследования и позволяют считать основную цель работы вполне достигнутой.

В целом диссертационная работа И. Р. Насибуллина отличается научной новизной, практической значимостью для изучения систем бактериофаг-бактерия, логичной схемой проведённых исследований, информативными иллюстрациями, поясняющими результаты экспериментов. В особенности хочется отметить проведённые работы по практическому внедрению полученных автором фундаментальных результатов.

Несмотря на общее положительное впечатление от диссертационной работы И. Р. Насибуллина, были выявлены некоторые неясности и замечания, которые не снижают ценность результатов, полученных автором, и не оказывают влияния на общую положительную оценку диссертационной работы.

В качестве **замечаний** необходимо отметить следующие:

1. Текст диссертации содержит довольно большое количество опечаток и орфографических ошибок, пропущенных на этапе редактирования работы. Например, в выводе 5 написано «Определенны параметры... идентифицировать данную бактерию за 36-38 часа».
2. Приложение 8, представляющее собой нуклеотидную последовательность исследованного в работе бактериофага, помещено без какой-либо аннотации последовательности, хотя аннотация рассматривается в тексте. Приведение в приложении документа в формате Genbank существенно облегчило бы его восприятие.



3. Вероятно, в разделе «Заключение» можно было бы сделать более глубокое обобщение практических свойств исследованных объектов – из-за высокой детализации материала, уже рассмотренного ранее, заключение оказывается более сложным для восприятия.
4. Считаю, что выводы по работе также могли бы быть безболезненно укрупнены, это бы также облегчило их восприятие.
5. Вывод 7 содержит неудачную формулировку «...белков ...имеющих своё место локализации в фаговом геноме». Имеются в виду, наверное, не сами белки, а локализованные в геноме фага открытые рамки считывания, идентифицированные при биоинформационном анализе.

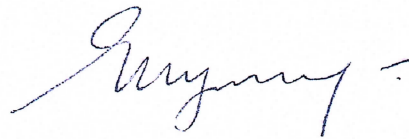
Работа Насибуллина Ильдара Равильевича - хорошо продуманное, логически выстроенное современное комплексное исследование, выполненное на высоком методическом уровне и нацеленное на получение новых и важных научных данных. Это цельное исследование, отвечающее на поставленные задачи и имеющее перспективу для дальнейших исследований и практических приложения. Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертационной работы. Полученные результаты в достаточной степени представлены в печатных работах. Опубликовано 15 работ, 4 из которых в рецензируемых научных журналах. Результаты исследований доложены на многочисленных научных международных и российских конференциях.

### **Заключение**

Вышеизложенное свидетельствует о том, что диссертация Насибуллина Ильдара Равильевича на тему: «Индикация и идентификация *Aeromonas hydrophila* с использованием биопрепарата на основе специфического бактериофага», выполненная под руководством д.м.н. Нафеева Александра Анатольевича, является законченной научно-квалификационной работой.

По актуальности, достоверности, научной новизне и практической значимости результатов, объёму проведённых исследований, настоящая работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук и критериям, установленным п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября

2013 года, а её автор, Насибуллина Ильдара Равильевич, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.



Куликов Евгений Евгеньевич

Кандидат биологических наук по специальностям:

03.01.03 – молекулярная биология,

03.01.14 – антропология,

Старший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)».

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Тел. +7 (495) 954-52-83

Факс +7 (495) 954-27-32

e-mail: kulikov.ee@mipt.ru

Подпись Е. Е. Куликова заверяю

Ученый секретарь ИНМИ РАН,

д.б.н.



И. С. Мысякина

25 ноября 2020 г.