

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет ветеринарной
медицины», доктор ветеринарных наук,
профессор, член-корреспондент РАН

К.В. Племяшов

2025 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» на диссертационную работу Ломакина Артёма Андреевича: «Разработка методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*», представленную к защите в диссертационном совете 35.2.035.01 на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3. – Инфекционные болезни и иммунология животных.

Актуальность диссертационного исследования. Актуальность диссертационной работы Ломакина Артём Андреевича обусловлена необходимостью разработки современных методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*. Некоторые исследователи полагают, что *A. hydrophila* является основным возбудителем инфекции на рыбоводческих предприятиях, приводящих к массовой гибели рыбы и значительным экономическим потерям. В связи с этим требуется разработать методы выявления *A. hydrophila*, которые будут учитывать на анализ бактериологических и молекулярно-генетических показателей. Эти методы могут быть интегрированы в комплексную систему тестирования для проведения мониторинга.

Научная новизна. В рамках диссертационного исследования была проведена проверка разработанной комплексной системы тестирования для выявления и идентификации бактерий вида *A. hydrophila*. В ходе работы было проанализировано 91 образец, взятых в рамках санитарного контроля. В результате была сформирована коллекция из 15 полевых изолятов. Из них 10 были идентифицированы как *A. hydrophila*, а 5 — как представители рода *Aeromonas* на основании анализа участков генов, кодирующих 16S рРНК и *gyrB*. Были подобраны праймеры для идентификации бактерий рода *Aeromonas*, включая *A. hydrophila*, с использованием метода ПЦР и последующего анализа результатов с помощью электрофореза. Также была оптимизирована система праймеров для идентификации *A. hydrophila* на основе специфического участка, кодирующего ген клеточного деления *zipA*, с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Впервые в России был разработан метод обнаружения ДНК *A. hydrophila* с использованием петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Степень обоснованности и достоверность основных научных положений, выводов и рекомендаций, апробация, отражение результатов исследований в публикациях. В соответствии с темой и структурой, диссертация Ломакина А. А. соответствует выбранному направлению исследования. Достоверность и обоснованность научных исследований подтверждается анализом литературных и экспериментальных данных, полученных в ходе научной работы. Автор диссертации сформулировал свои научные положения на основе методически корректной обработки достаточного по объёму и качеству фактического материала. В процессе исследования применялись комплексный анализ и системный подход. Автор использовал теоретико-методологический анализ литературы и эмпирические методы исследования. Сочетание этих методов позволило обеспечить достоверность полученных результатов и сделанных выводов.

Итоги диссертационного исследования были продемонстрированы на следующих мероприятиях: Национальная научно-практическая конференция, посвящённая памяти выдающегося учёного, доктора медицинских наук, профессора Леонида Фёдоровича Зыкина (Саратов, 2023). Национальная научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные аспекты и практические вопросы современной микробиологии и биотехнологии», посвящённая памяти профессора Д. А. Васильева (Ульяновск, 2024), X Всероссийская Пушкинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2024). По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов исследований.

В рамках диссертационного исследования была разработана комплексная тест-система для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila*, включающая бактериологический и молекулярно-генетический компоненты.

Данная система позволяет дополнить теоретическую базу о распространении этого инфекционного агента в объектах окружающей среды и у гидробионтов.

Также была усовершенствована схема выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* из объектов окружающей среды и патологического материала. В основу схемы положены морфологические и биохимические особенности метаболизма возбудителей аэромоназа. Схема позволяет типировать искомый вид бактерии в течение 198 часов.

В состав молекулярно-генетической части тестовой системы входят два метода: ПЦР с детекцией в режиме реального времени (длительность - 2 часа) и LAMP (длительность - 1,5 часа).

Были определены показатели антибиотикорезистентности у выделенных 10 полевых изолятов *A. hydrophila*. Также был проведён анализ наличия в их геномах участков генов, кодирующих факторы вирулентности. Для лабораторной практики предложены методы штаммового типирования изолятов *Aeromonas*, основанные на методах BOX-ПЦР и ERIC-ПЦР.

По итогам исследования были разработаны методические рекомендации по использованию набора реагентов для обнаружения и идентификации ДНК *A. hydrophila* методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени и методические рекомендации по использованию набора реагентов для выявления *A. hydrophila* методом LAMP.

Структура, объем и содержание работы, соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Представленная соискателем работа построена по традиционному плану, изложена на 192 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, состоящие из объектов, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, приложения. Список литературы состоит из 420 источников, из которых 409 иностранных. Работа иллюстрирована 22 таблицами и 31 рисунками. В приложении представлена копия патента, и два акта о внедрении НИОКР, что подтверждает новизну и практическую значимость работы.

Во введении диссертант обосновывает выбор темы, её актуальность, определяет цель и задачи исследования, формулирует её научную новизну, теоретическую и практическую значимость.

В главе «Обзоре литературы» автор приводит описание свойств биологических и молекулярно-генетических свойств бактерий *Aeromonas hydrophila*, имеющих в мировой практике методы выделения и идентификации бактерий рода *Aeromonas*. Анализ литературных данных подтверждает важность разработки современных методов выявления и идентификации бактерий данного рода *Aeromonas*.

В главе «Собственные исследования» представлены методы исследований> изложены схемы исследований и указаны использованные методики. Алгоритм исследования соответствует цели и задачам диссертационной работы. Исследования проведены согласно общепринятым лабораторным (бактериологические и молекулярно-генетические) методам. Использование данных методов потребовало от диссертанта использовать современное высокоточное оборудование и реактивы.

В разделе «Результаты исследований и их обсуждение» представлены результаты исследований биологических свойств референс - штамма *A. hydrophila*, на основе изучения которых разработан бактериологический компонент схемы выделения и идентификации. Произведён подбор праймеров и условий амплификации тест-систем для идентификации рода *Aeromonas* с электрофоретическим методом детекции результата, и праймерные системы для выявления ДНК *A. hydrophila* методами ПЦР в режиме «реального времени» и петлевой изотермической амплификации.

В результате апробации представленной комплексной системы для выявления и идентификации *A. hydrophila* была сформирована коллекция штаммов рода *Aeromonas*, в частности *A. hydrophila*. Изучены биологические и молекулярно-генетические свойства выделенных изолятов в сравнении с референс-штаммами *Aeromonas*.

В главе «Заключение» представлены итоги выполненного исследования. Был выполнен сравнительный анализ полученных результатов с литературными данными по данной тематике исследований.

Рекомендации по дальнейшему использованию результатов и выводов диссертационной работы. Выводы соответствуют цели и задачам работы; предложения производству доступны для внедрения в условиях лабораторной практики. Приложение диссертации подтверждает научную и практическую значимость работы. Дальнейшая работа над темой предполагает увеличение коллекции бактериальных изолятов рода *Aeromonas* с расширением географии мест отбора проб и номенклатуры объектов ветеринарно-санитарного контроля в качестве образцов для исследований. Определение генов вирулентности у выделенных изолятов *A. hydrophila* позволит оценить их потенциальную патогенность. Изучение экспрессии этих генов предоставит данные для прогнозирования эпизоотической ситуации по аэромонозу при анализе воды в определённых акваториях. Методы ВОХ-ПЦР и ERIC-ПЦР показали свою эффективность в штаммовой типизации и могут быть использованы в качестве инструмента для эпизоотического мониторинга и скрининговых исследований.

Замечания и вопросы. Ознакомившись с диссертационной работой и авторефератом Ломакина Артёма Андреевича, к замечаниям следует также отнести единичные орфографические ошибки и неудачные стилистические выражения. Диссертация и автореферат Ломакин А. А. изложены доступным языком, оформлены в соответствии с требованиями ВАК РФ для соответствующих научных работ. Автореферат в достаточной мере отражает содержание диссертационной работы. Оценивая положительно представленную к защите диссертационную Ломакина Артёма Андреевича, отмечая её завершенность и практический вклад, к автору имеются следующие вопросы:

1. В работе Вы указали ряд методов для детекции представителей рода *Aeromonas*, в частности *A. hydrophila*. Чем был обусловлен выбор именно этих методов?

2. Какой процент корреляции полученных результатов между бактериологическим и молекулярно-генетическими компонентами разработанной схемы выделения и идентификации? Какой процент достоверности разработанных методов в сравнении с подходами представленных в нормативной документации?

3. Какая экономическая эффективность данных подходов для лабораторной диагностики возбудителя аэромоноза?

4. В работе указаны методы для диагностики *A. hydrophila*, однако не указаны способы лечения и профилактики данной инфекции. Будут ли вестись работы в этом направлении?

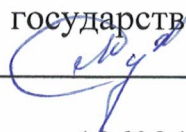
Заключение

Диссертация Ломакина Артём Андреевича на тему "Разработка методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*", является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, в которой решена важная задача диагностики и типизации штаммов возбудителя аэромоназа рыб. Диссертационная работа соответствует критериям п. 9 "Положение о порядке присуждения учёных степеней", постановления правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор, Ломакин Артём Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных.

Диссертация, автореферат и отзыв обсуждены и одобрены на заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» 14 апреля 2025 года, протокол № 11.

Отзыв составили:

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

 Сухинин Александр Александрович

Адрес организации: 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

т./факс (812)388-36-31

E-mail: mail@spbguvvm.ru

www.spbguvvm.ru