

## ОТЗЫВ

**Пименова Николая Васильевича – доктора биологических наук, профессора, заведующего кафедрой иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К. И. Скрябина, официального оппонента на диссертационную работу Ломакина Артема Андреевича на тему: «Разработка методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по научной специальности**

### **4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных.**

**Актуальность темы.** Аквакультура – одна из самых быстрорастущих отраслей промышленности, обеспечивающая более половины всего мирового производства рыбы. Бактерии *Aeromonas hydrophila* представлены как оппортунистами, так и патогенными микроорганизмами, вызывающими заболевания у рыб с высокой смертностью и большими экономическими потерями. За последние годы неблагоприятные по аэромоназу хозяйства эпизодически регистрируются в Российской Федерации, в том числе на территории Московской, Оренбургской, Кировской, Челябинской, Тверской и Свердловской областей.

Для выделения и идентификации *A. hydrophila* в лабораторных условиях в настоящее время используют «Методические указания по диагностике аэромоназа (краснухи) карпов», однако в этих методических указаниях не представлены методы для точной идентификации *A. hydrophila* от других представителей данного рода, в том числе не имеющих эпизоотического значения. В связи с этим актуальной является разработка современных методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*. В этой связи тема исследования и поставленная цель представляют собой научно-практический интерес и являются актуальными.

**Научная новизна.** Подобраны праймерные системы для идентификации бактерий рода *Aeromonas*, в том числе и *A. hydrophila*, методом ПЦР с детекцией результата электрофоретическим методом, подобрана и оптимизирована система праймеров для идентификации бактерии *A. hydrophila* по специфичному участку, кодирующему ген клеточного деления (*zipA*), методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени», а также впервые разработана в РФ схема детекции ДНК бактерий *A. hydrophila* методом петлевой изотермической амплификации (LAMP). Выделенные изоляты были проверены на наличие участков генов, кодирующих факторы вирулентности, в частности: гемолизин (*hlyA*), аэролизин (*aerA*), АДФ-рибозилирующий токсин (*aehT*), цитотонический термоллабильный энтеротоксин (*alt*), компоненты системы секреции T3SS (*aopB* и *ascV*), ген термостабильного цитотонического энтеротоксина (*ast*), белок, кодирующий субъединицу жгутика (*fla*), липазу (*lip*), эластазу (*ela*), ген шига-токсина (*stx-1*), систему секреции шестого типа (*vasH*). Кроме того, было изучено



генетическое родство референс-штаммов представителей рода *Aeromonas* и полевых изолятов *A. hydrophila* сравнением геномных фингерпринтов методами энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей (ERIC) и при помощи BOX-элементов.

**Степень обоснованности и достоверность основных научных положений, выводов и рекомендаций, апробация, отражение результатов исследований в публикациях.** По содержанию и изложению диссертация Ломакина Артема Андреевича соответствует избранному направлению. Обоснованность направления исследований соискателя определяется, прежде всего, имеющейся проблемой отсутствия в Российской Федерации актуальных методов для точной идентификации *A. hydrophila* от других патогенных представителей данного рода.

Высокий уровень методических и методологических подходов с использованием комплекса современных и классических методов исследований, используемых в их оптимальном сочетании, позволили диссертанту реализовать сформулированные цель и задачи, сделать достоверные выводы и дать практические предложения, которые логически вытекают из содержания диссертации. Достоверность результатов исследований базируется на применении современных методик анализа, использовании сертифицированного оборудования, статистической обработки результатов исследований. Не вызывают сомнения достаточность объемов исследования и их качество.

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на международных научно-практических конференциях: Национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Леонида Федоровича Зыкина (Саратов, 2023), Национальной научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты и практические вопросы современной микробиологии и биотехнологии», посвященной памяти профессора Д.А. Васильева (Ульяновск, 2024), X Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, 2024).

По материалам исследований опубликовано 8 работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

**Теоретическая и практическая значимость полученных результатов исследований.** В результате проведенных исследований диссертантом создана инновационная диагностическая система для обнаружения и определения бактерий *A. hydrophila*, сочетающая классические бактериологические методы с современными молекулярно-генетическими технологиями. Это позволяет существенно расширить научные знания о распространении данного патогена в окружающей среде и среди водных организмов. Разработан усовершенствованный протокол выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* из различных образцов, основанный на характерных морфологических и биохимических особенностях возбудителей аэромоноза. Полный процесс типирования занимает всего 198 часов. Для лабораторных исследований предложены методы штаммового типирования *Aeromonas* с использованием BOX-ПЦР и ERIC-ПЦР.



При тестировании разработанной системы из 91 пробы объектов ветеринарно-санитарного надзора было выделено 10 полевых изолятов, у которых были определены профиль устойчивости к антибактериальным препаратам и наличие генов вирулентности.

На основе исследования разработаны методические рекомендации:

«Методические указания по применению набора реагентов для выявления и идентификации ДНК *Aeromonas hydrophila* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»; «Методические указания по применению набора реагентов для выявления *Aeromonas hydrophila* методом LAMP (петлевой изотермической амплификации).

**Структура, объем и содержание работы, соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.** Диссертация состоит из 192 страниц машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические предложения по использованию результатов исследования, список использованной литературы (420 источников, в том числе 409 научных работ иностранных авторов). Диссертация содержит 24 таблицы, 31 рисунков, 6 приложений.

В главе «Введение» представлены актуальность темы исследований, степень разработанности темы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, степень достоверности и апробация результатов исследований, личный вклад автора, публикации, структура и объем диссертации, основные положения, выносимые на защиту. Нельзя не отметить глубину «Обзора литературы» по изучаемому вопросу: проведено большое теоретическое исследование, свидетельствующее об эрудиции автора и системном подходе к исследованиям. Раздел, посвященный собственным исследованиям, подразделяется на подразделы, в которых полно и доступно описываются материалы и методы проведенных исследований, результаты собственных исследований, посвященные изучению, разработке и оценке диагностической системы для обнаружения бактерий *A. hydrophila*, а также приводится глубокий анализ полученных данных, сопоставленный с имеющимися литературными сведениями.

В главе «Заключение» представлены итоги выполненного исследования. Высокого уровня по итогам работы стали рекомендации по практическому использованию научных выводов и перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

Автореферат выполнен в соответствии с основными положениями диссертационной работы.

**Рекомендации по дальнейшему использованию результатов и выводов диссертационной работы.** Исследование планируется развивать в нескольких ключевых направлениях. Основное внимание будет уделено расширению коллекции изолятов *Aeromonas spp.* за счет увеличения географии сбора образцов и разнообразия объектов ветеринарно-санитарного надзора.



Анализ генов вирулентности выделенных штаммов *A. hydrophila* поможет оценить их патогенный потенциал. Изучение экспрессии этих генов позволит прогнозировать распространение аэромоноза в конкретных водных объектах.

Продemonстрировавшие эффективность методы BOX-ПЦР и ERIC-ПЦР могут стать важным инструментом эпизоотологического мониторинга и скрининга. С их помощью можно проводить детальное типирование штаммов. Созданная комплексная тест-система позволяет исследовать различные образцы окружающей среды и патологический материал для формирования коллекции штаммов *A. hydrophila* и других представителей рода. Это поможет определить их распространение в природе.

Разработанные и представленные в диссертации методики имеют большой потенциал для внедрения в повседневную работу ветеринарных лабораторий.

**Замечания и вопросы.** Ознакомившись с предложенным материалом, необходимо отметить, что диссертация Ломакина Артема Андреевича оформлена и изложена грамотно, доступно, хорошо иллюстрирована. Все научные положения и выводы, предложенные диссертантом, вытекают из содержания работы. Полученные результаты научно обоснованы, достоверны и не вызывают сомнений. Содержание автореферата соответствует материалам диссертации.

При рассмотрении кандидатской диссертации Ломакина Артема Андреевича на тему «Разработка методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*» возникло несколько замечаний и пожеланий:

1. В диссертационной работе был использован метод детекции результата амплификации путём высвобождения гасящей реакции (DARQ). Почему выбран этот метод и какие методы применяются для детекции результатов петлевой изотермической амплификации при детекции результатов?

2. Являются ли верифицированными методами BOX- и ERIC- ПЦР для типизации патогенов гидробионтов? Применяются ли эти методы при типизации штаммов по данным научной литературы?

3. Изучалась ли чувствительность выделенных изолятов бактерий *Aeromonas hydrophila* к бактериофагам? Планируете ли Вы проводить это изучение, в дальнейшем, и какой, на Ваш взгляд, потенциал у фаготерапии и у фаготипирования при аэромонозе?

4. Автор в выводах отражает, что сформирована коллекция из 15 штаммов: 10 *A. hydrophila*, 1 *A. bestiarum* и 4 *Aeromonas spp.* К работе следовало бы приложить папорта этих штаммов. Какие из них депонированы и в какой коллекции? Оценена ли их вирулентность? И на каких моделях?

Перечисленные вопросы и замечания не умаляют достоинство и достоверность результатов диссертационной работы и не влияют на ее положительную оценку.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По актуальности избранной темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне диссертационное исследование Ломакина Артема

Андреевича на тему: «Разработка методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*», соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Ломакин Артем Андреевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных.

Пименов Николай Васильевич,  
доктор биологических наук по специальностям  
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии),  
06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология,  
профессор,  
заведующий кафедрой иммунологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина»,  
профессор РАН  
109472 г. Москва, ул. Ак. Скрябина, д. 23  
Тел.: +7 (495) 377-91-17  
e-mail: rector@mgavm.ru



Н.В. Пименов

16.04.25

Подпись доктора биологических наук, профессора,  
заведующего кафедрой иммунологии и биотехнологии заверяю  
Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина»,  
К.С.-Х.Н.,  
доцент



С.С. Маркин