

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
П.А.СТОЛЫПИНА»

(ФГБОУ ВО Омский ГАУ)

644008, г. Омск-8, ул. Институтская площадь, 1, тел. (3812) 65-11-46, факс 65-17-35

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора ветеринарных наук, профессора Плешаковой Валентины Ивановны на диссертацию Ломакина Артёма Андреевича на тему: «Разработка методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*», представленную к защите в диссертационный совет 35.2.035.01 при ФГБОУ ВО "Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова", на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных.

Актуальность темы. Одной из основных причин снижения рентабельности рыбоводческих хозяйств являются инфекционные болезни, в том числе аэромоноз рыб, обусловленный *Aeromonas hydrophila*. Для эффективной профилактики и лечения аэромоноза обеспечивающим фактором является надёжная диагностика инфекции. Необходимо отметить, что в настоящее время в ветеринарной практике микробиологические методы диагностики аэромонозной инфекции, как правило, характеризуются использованием временно затратных тест-систем, дифференциально-диагностических питательных сред. В то же время, для выбора тактики и стратегии проведения противоэпизоотических мероприятий необходимо сокращение сроков идентификации и получения надёжных результатов лабораторных исследований. В связи с этим, в практике ветеринарных лабораторий происходит постоянное совершенствование методов идентификации *A. hydrophila*. Наряду с бактериологическими методами для обнаружения в патологическом материале возбудителя аэромоноза используют автоматизированные системы идентификации и системные микропланшеты, которые имеют ограниченное применение для некоторых видов *Aeromonas*.

Кроме того, в ряде случаев установлена недостоверность полученных результатов. Исходя из вышеуказанного, разработка и тестирование комплексной тест-системы выделения и идентификации бактерий *Aeromonas*

Aeromonas hydrophila, основанной на бактериологических и молекулярно-генетических методах является актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертационная работа выполнена лично аспирантом в ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, в рамках выполнения НИР по заданию МСХ РФ № 12303 16000 41-9 «Разработка комплекса мероприятий по борьбе с аэромоназом рыб».

Достаточно высокий методический уровень проведенных исследований с применением общепринятых и современных молекулярно-генетических методов, свидетельствует о достоверности и обоснованности полученных результатов.

Выводы и практические предложения обоснованы объемом исследований - 10 штаммов *A. hydrophila*, выделенных из объектов внешней среды и патологического материала, а также применением современных методов исследования.

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций. Апробация разработанной комплексной тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* из объектов санитарного надзора, позволила сформировать коллекцию, включающую 15 полевых изолятов, 10 из которых были идентифицированы как *A. hydrophila*, 5 - отнесены к роду *Aeromonas* spp., на основании детекции участков генов, кодирующих 16S рРНК и *gyrB*.

Для обнаружения бактерий рода *Aeromonas* (в том числе *A. hydrophila*) методом ПЦР с детекцией результата амплификации электрофоретическим методом соискателем были подобраны праймерные системы, в том числе специфическому участку, кодирующему ген клеточного деления (*zip A*).

Впервые разработана схема детекции ДНК бактерий *A. hydrophila* методом петлевой изометрической амплификации (LAMP).

Впервые дана молекулярно-генетическая характеристика 10 штаммов *A. hydrophila*, у которых обнаружено наличие генов кодирующих факторы вирулентности, в частности: гемолизин, аэролизин, АДФ-рибозилирующий токсин, цитотонический термолабильный энтеротоксин, компоненты системы секреции T3SS, ген термостабильного цитотонического энтеротоксина, белок, кодирующий субъединицу жгутика, липазу, эластазу, ген шига-токсина, систему секреция шестого типа.

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.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследований. Разработана комплексная тест-система для детекции и идентификации бактерий *A. hydrophila*, включающая бактериологический и молекулярно-

генетический компонент, использование которой позволяет дополнить теоретическую базу о распространении данного инфекционного агента в объектах окружающей среды и у гидробионтов.

Усовершенствована схема выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* из объектов окружающей среды и патологического материала, в основу которой положены морфологические и биохимические особенности метаболизма возбудителей аэромоноза. Разработанная схема позволяет типировать искомый вид бактерии в течение 198 часов.

Молекулярно-генетический компонент тест-системы включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией результатов амплификации в режиме «реального времени» (время исследования - 2 часа) и метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) (время исследования - 1,5 часа). Определены показатели антибиотикорезистентности у 10 выделенных полевых изолятов *A. hydrophila* и проанализировано наличие в их геномах участков генов, кодирующих факторы вирулентности.

Тестирование комплексной тест-системы для выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* было проведено на базе Самарского филиала ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Для лабораторной практики предложены методы штаммового типирования изолятов *Aeromonas*, основанные на методах BOX-ПЦР и ERIC-ПЦР.

По результатам диссертации разработаны: «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 петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Результаты используются в учебном процессе ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина при чтении лекции по направлениям подготовки: 06.03.01 Биология, 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза, 36.05.01 Ветеринария, 06.04.01 Биология, 36.04.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность работы обеспечена применением общепринятых и широко распространённых, а также молекулярно-генетических методик, многократным повторением экспериментов, воспроизводимостью и соответствием результатов, а также использованием поверенного измерительного оборудования и аттестованных методик исследования.

Результаты диссертационной работы были апробированы и представлены на: 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 Пушкинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2024).

Оценка содержания, завершённость работы и качество её оформления. Представленная диссертационная работа оформлена по общепринятому плану в виде одного тома. Диссертация содержит следующие главы: введение, обзор литературы, собственные исследования (объекты, материалы и методы), результаты исследований, их обсуждение, заключение и выводы, список использованных литературных источников, список сокращений, условных обозначений и приложения.

Общий объём диссертационной работы включает 195 печатных страниц, 31 рисунок, 23 таблицы. Список литературы содержит 420 источников, из них 409 зарубежных авторов.

Основные научные результаты опубликованы в 8 научных статьях, из них 3 в изданиях, включенных в перечень ВАК Минобрнауки РФ.

Во «Введении» соискатель убедительно обосновывает актуальность темы исследования, логично формулирует цель, задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, выносит основные положения на защиту.

В главе «Обзор литературы» с использованием большого количества научной литературы соискатель проводит анализ современного состояния изученности биологических особенностей возбудителя аэромоназа. Значительное внимание уделено таксономии бактерии рода *Aeromonas*, насчитывающего 36 видов. Описано распространение бактерий *Aeromonas* в водной среде, в том числе энтеропатогенных представителей в бытовых водопроводах, что представляет проблему для общественного здравоохранения. Данные бактерии обнаруживаются в различных пищевых продуктах, при этом зафиксирована устойчивость выделенных изолятов к клинически значимым антибиотикам.

Особое внимание уделено результатам изучения *A. hydrophila*, как основного патогена, вызывающего заболевание рыб на рыбоводческих фермах, сопровождающееся большими экономическими потерями.

В разделе 1.1.4 приведён анализ эпизоотической ситуации по аэромоназу на территории Российской Федерации, подтверждающий неблагополучие по данному карантинному заболеванию во многих регионах страны.

Особое внимание в обзоре литературы отведено характеристике геномов бактерий *A. hydrophila*. Дана оценка факторам вирулентности *A. hydrophila*, как важного зоонозного патогена, которые играют ключевую роль в патогенезе болезни.

Соискателем описаны схемы выделения бактерий рода *Aeromonas* из окружающей среды, в том числе с применением ПЦР, генетических зондов,

LAMP и других наборов иностранного производства, что обосновывает необходимость разработки собственных лабораторных инструментов.

В главе 2 «Собственные исследования» в разделе 2.1. описаны материалы и методы, включающие бактериологические, биохимические, генетические (выделение ДНК, подбор праймеров для детекции бактерий *A. hydrophila* методами ПЦР-РВ и RT-LAMP). Постановка реакций была выполнена на основе геномов бактерий рода *Aeromonas*, представленных в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и на сайте Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Конструирование праймеров LAMP проведено при помощи Explore V5. Специфичность разработанных праймеров подтверждена в системе BLAST на сервере Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

Объекты исследования составили пробы (n=91) объектов санитарного надзора включающие 5 проб гидробионтов и 86 воды из водоёмов, находящихся на территории Ульяновской, Самарской областей и Республики Чувашия.

Глава 2.2 «Результаты исследования и их обсуждение» включает 8 разделов, в которых изложены биологические свойства референс-штамма *A. hydrophila* ATCC 49140 отражённые в таблицах 1 и 2.

Для накопления штаммов *A. hydrophila* соискателем был экспериментально подобран состав питательной среды, а именно агар с желчными солями и иргасановым бриллиантовым зеленым. В сравнительном аспекте было изучено 6 видов питательных сред с посевом 7 штаммов, в результате была отработана схема выделения и идентификации бактерий вида *A. hydrophila* из объектов окружающей среды и патологического материала.

В разделе 2.2.3. отражены молекулярно-генетические исследования, а именно разработка метода ПЦР с электрофоретической детекцией результата амплификации.

Из-за сложного типирования бактерий рода *Aeromonas* в качестве дополнительного инструмента для родовой идентификации был произведен подбор праймерной системы для выявления участка гена, характерного для *Aeromonas* spp.

Соискателем был произведён подбор праймеров для выявления гена, характерного *Aeromonas* spp., который позволил установить родовую принадлежность полевых изолятов бактерий к роду *Aeromonas*.

В разделе 2.2.6. представлены результаты изучения антибиотикорезистентности выделенных штаммов. Установлено, что выделенные изоляты *Aeromonas* обладают резистентностью к β-лактамам пенициллинам, к аминогликозидам, линкозамидам и производным нитрофуранов.

Соискателем исследованы факторы вирулентности выделенных штаммов *Aeromonas* на уровне генов, у 86,6% выявлена гемолитическая,

протеолитическая и ДНКазная активность, что подтверждает их потенциальную опасность как для гидробионтов, так и человека.

В разделе 2.2.8. отражено генотипирование выделенных изолятов *Aeromonas* spp. методами ERIC- и BOX-ПЦР с целью определения их генотипа при помощи последовательностей праймеров.

Генотипирование методом BOX-ПЦР позволило разделить бактерии *A. hydrophila* на две основные геногруппы. К первой были отнесены 5 штаммов, выделенные в Чувашской и Самарской областях и Чувашской Республики. Во вторую входили штаммы, выделенные от рыб без патологических изменений.

На основании дендрограммы исследуемых штаммов *A. hydrophila*, полученной на основе ERIC-ПЦР, весь пул бактерий был разделен на три основных генотипа с учетом гомологии.

Данные методы позволили провести дифференциацию штаммов и выполнить кластерный анализ при помощи генетических элементов. Применяемые методы позволяют осуществлять эпизоотологическую оценку циркулирующих в окружающей среде штаммов бактерий этого рода.

Проведенное в рамках исследования генотипирование выделенных изолятов *Aeromonas* spp. позволило выполнить кластерный анализ и установить степень родства экспериментального пула бактерий рода *Aeromonas*.

Полученные результаты и научные выводы рекомендуется использовать для исследования проб объектов окружающей среды и патологического материала с целью формирования коллекции штаммов *A. hydrophila*, а также эпизоотологического мониторинга.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертационной работы. Диссертация и автореферат соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (от 24.09.2013. № 842).

При общей положительной оценке по диссертации возникли вопросы и замечания:

1. Проводилось ли сравнительные исследования предлагаемых методов (ПЦР-РВ и RT-LAMP) с учётом их специфичности и чувствительности?
2. Наблюдались ли различия в биохимических показателях выделенных штаммов?
3. При определении антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов *Aeromonas* с помощью каких критериев осуществляли интерпретацию?
4. Чем объясняете изучение биологических свойств референс-штамма *A. hydrophila* ATCC 49140?

В диссертационной работе содержатся отдельные опечатки, которые не снижают научную и практическую значимость работы и не могут отразиться на общей положительной оценке.

Заключение. Диссертационная работа Ломакина Артёма Андреевича на тему: «Разработка методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых бактериями *Aeromonas hydrophila*» выполнена автором самостоятельно, на достаточно высоком методическом уровне, с использованием большого экспериментального материала с применением классических и современных методов исследования, является законченной научно-квалификационной работой.

Считаю, что по актуальности, теоретической и практической значимости, а также объёму проведённых исследований, представленная диссертация в полной мере соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемых к кандидатской диссертациям, а ее автор, Ломакин Артём Андреевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных.

23.04.2025г.

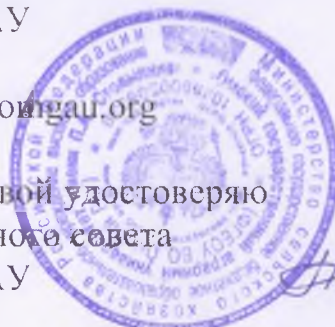
Официальный оппонент:

Профессор кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВО Омский ГАУ, профессор, доктор ветеринарных наук (16.00.03 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология; 16.00.02 Патология, онкология и морфология животных)

Плешакова
Валентина Ивановна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» (ФГБОУ ВО Омский ГАУ)
644008 г. Омск-8, ул. Институтская площадь, 1
ФГБОУ ВО Омский ГАУ
Тел. 8(3812) 25-05-19
E.-mail: vi.pleshakova@omgau.org

Подпись В.И. Плешаковой удостоверяю
Ученый секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО Омский ГАУ



Н.А. Дмитриева