

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук, доцента Феоктистовой Натальи Александровны на диссертацию Киянчук Маргариты Владимировны на тему: «Интраназальное применение бактериофагов при бронхопневмониях телят инфекционной этиологии», представленную к защите в диссертационный совет 35.2.034.01 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных.

Актуальность темы. Инфекционные болезни респираторной системы крупного рогатого скота, в частности бронхопневмония, представляют собой одну из ведущих причин гибели животных и наносят значительный экономический ущерб животноводству в мире и Российской Федерации, включая Ленинградскую область. Согласно статистическим данным, заболевания дыхательной системы регистрируются у 25% телят в течение первого года жизни. Этиологическая структура патологий характеризуется сочетанием нескольких бактериальных патогенов, среди которых ключевое значение имеют *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida*, выявляемые практически во всех отделах респираторного тракта. В условиях промышленного животноводства при скученном содержании и воздействии стрессовых факторов наблюдаются смешанные формы инфекции с участием пастерелл, сальмонелл и других условно-патогенных микроорганизмов.

Традиционные методы борьбы с болезнями инфекционной этиологии, основанные на широком применении антибиотиков, демонстрируют резкое снижение эффективности. Бесконтрольное использование антибактериальных средств привело к масштабному распространению резистентных штаммов, при этом уровень устойчивости выделенных от больных телят микроорганизмов к бензилпенициллину достигает 89,8%, а к линкомицину - 96,9%. В сложившейся ситуации применение литических бактериофагов является необходимой альтернативой или дополнением к существующим схемам лечения, позволяя эффективно воздействовать на возбудителей, обладающих лекарственной устойчивостью.

Особую актуальность представляет поиск природных вирулентных фагов, способных разрушать бактериальные биопленки, наличие которых снижает эффективность стандартной терапии. Использование комбинированных схем, сочетающих бактериофаги и антибиотики, усиливает эрадикацию бактерий и предотвращает появление новых устойчивых штаммов. Применение фаговых препаратов интраназальным методом обеспечивает высокую биодоступность в очаге воспаления и позволяет избежать быстрой инактивации вирусных частиц в печени. Внедрение препаратов на основе бактериофагов в лечебно-профилактические мероприятия в условиях животноводческих комплексов необходимо для сохранения поголовья и поддержания продуктивности животных на фоне нарастающей антибиотикорезистентности.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно в период с 2022 по 2025 год на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Достаточно высокий методический уровень проведенных исследований, характеризующийся применением комплекса общепринятых бактериологических методов в сочетании с методами электронной микроскопии и масс-спектрометрии (MALDI-TOF), свидетельствует о достоверности и обоснованности полученных результатов.

Выводы и практические предложения обоснованы значительным объемом экспериментальных исследований, включающих обследование 369 телят и анализ соразмерного количества образцов носоглоточной слизи, а также изучение 50 проб сточных вод. Обоснованность положений подтверждается результатами изоляции и идентификации штаммы микроорганизмов, среди которых детально изучены представители родов *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Moraxella* и *Mannheimia*. Достоверность полученных данных подкреплена оценкой биохимических свойств 229 культур и определением их чувствительности к антимикробным препаратам.

Научные положения базируются на результатах изучения литической активности бактериофагов и их способности ингибировать биопленки *Klebsiella pneumoniae*, подтвержденных в сериях опытов с применением спектрофотометрии. Обоснованность рекомендаций по интраназальной фаготерапии подтверждена постановкой биопроб на лабораторных мышах и результатами производственных испытаний, продемонстрировавших высокую лечебную эффективность разработанных подходов. Статистическая обработка данных в таблицах и визуализация результатов подчеркивают объективность сформулированных в работе выводов.

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций. Научная новизна проведенных исследований заключается в выделении и детальной характеристике специфического бактериофага, проявляющего высокую литическую активность в отношении гипермукоидных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих в животноводческих комплексах. В ходе работы экспериментально обоснована и доказана способность комплексного применения бактериофагов с коллоидным серебром эффективно ингибировать процесс формирования бактериальных биопленок *in vitro*, что открывает новые возможности для преодоления антибиотикорезистентности патогенов.

Впервые теоретически обоснован и практически реализован интраназальный метод введения фагосодержащих препаратов сельскохозяйственным животным. Разработанная и внедренная схема интраназальной инстилляций фаголизатов при бронхопневмонии телят инфекционной этиологии подтвердила свою рациональность и высокую терапевтическую эффективность в условиях промышленного животноводства. Экспериментально доказано, что своевременное применение бактериофагов позволяет купировать развитие патологического процесса в респираторной системе молодняка крупного рогатого скота.

Особое внимание в работе уделено малоизученному аспекту фагопрофилактики. Установлено, что эффективность предотвращения инфекции напрямую зависит от временного интервала между введением фага и моментом заражения, что подтверждено на модели интраназально инфицированных лабораторных мышей. В отличие от существующих подходов, автором проанализирована проблема бактериальной резистентности к фагам, которая в ряде случаев может лимитировать возможности эмпирического лечения и требовать дополнительных затрат. Продемонстрированная эффективность интраназальной терапии расширяет существующие представления о методах борьбы с респираторными патологиями и закладывает основу для создания новых схем ветеринарных мероприятий.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследований. Разработана и научно обоснована комплексная методология интраназальной фаготерапии респираторных инфекций телят, использование которой позволяет существенно дополнить теоретическую базу о возможностях биологического контроля антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Усовершенствована схема выделения и идентификации вирулентных бактериофагов из объектов окружающей среды (сточных вод), в основу которой положен метод микробного обогащения с применением мембранной фильтрации и экстракции трихлорметаном. Разработанный алгоритм селекции позволяет эффективно типировать и накапливать специфические фаголизаты для последующего применения в ветеринарной практике.

Практическая значимость подтверждается внедрением методики интраназального введения бактериофагов с использованием компрессорного распыления, обеспечивающего доставку действующих агентов непосредственно в очаги патологического процесса в респираторном тракте. Определены показатели чувствительности изолированных патогенов к антимикробным препаратам и бактериофагам, а также проанализирована способность возбудителей к формированию биопленок, что зафиксировано в базе данных «Оценка тенденции к образованию биоплёнки *Klebsiella pneumoniae* спектрофотометрическим методом» (№ 2026620103). Для лабораторной практики предложен метод визуализации литической активности вирусов бактерий, отраженный в базе данных «Морфология негативных колоний вирулентного бактериофага *Klebsiella pneumoniae*» (№ 2025625499).

По результатам диссертации разработаны и изданы «Методические рекомендации по интраназальному применению бактериофагов при бронхопневмониях телят в условиях животноводческих комплексов» (изд-во СПбГУВМ, 2025), утвержденные методическим советом университета (протокол № 10 от 17.12.2025). Результаты исследований внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» и используются при чтении лекций и проведении практических занятий по направлениям подготовки 36.05.01 Ветеринария и 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза. Тестирование предложенных схем фаготерапии было проведено на базе животноводческих хозяйств Ленинградской области, что подтверждено соответствующими актами о внедрении.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается использованием репрезентативной выборки объектов, полностью соответствующей поставленным целям и задачам согласно утвержденному плану работы. Обоснованность научных положений подкреплена неоднократной воспроизводимостью полученных данных в сериях повторных экспериментов и проведением всех манипуляций на сертифицированном лабораторном оборудовании. Высокий уровень достоверности гарантируется достаточным объемом обработанного фактического материала с применением методов вариационной статистики, адаптированных к специфике биологических исследований.

Основные результаты диссертационной работы прошли апробацию на научно-практических конференциях международного и национального значения в период с 2022 по 2025 год. Ключевые положения докладывались на XI международной научной конференции «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 2022), сериях международных конференций «Ветеринарная лабораторная практика» (Санкт-Петербург, 2023–2025), а также на конференции «Теория и практика клинической биохимии и лабораторной диагностики», посвященной 105-летию кафедры биохимии и физиологии СПбГУВМ (2024). Работа была представлена профессиональному сообществу на XXXII и XXXIII Московских международных ветеринарных конгрессах (2024–2025), а также в рамках Национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ (2025).

Оценка содержания, завершённости работы и качество её оформления. Диссертационная работа Киянчук М. В. оформлена в виде одного тома по общепринятому плану и включает введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы), результаты исследований и их обсуждение, а также заключение, выводы, практические предложения и приложения. Общий объем работы изложен на 175 страницах компьютерного текста, иллюстрирован 26 таблицами и 29 рисунками. Список литературы включает 285 источников, из которых 213 - зарубежных авторов. Научные результаты соискателя опубликованы в 9 работах, включая 6 статей в изданиях из Перечня ВАК при Минобрнауки РФ.

Во «Введении» автором сформулированы актуальность темы, цель, задачи, научная новизна и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» соискатель проводит анализ современного состояния изученности этиологической структуры бронхопневмонии телят и биологических особенностей ее возбудителей. В подразделе 1.1 дана характеристика факторов вирулентности основных патогенов респираторного тракта, включая представителей семейств *Pasteurellaceae* и *Enterobacteriaceae*. Подраздел 1.2 «Биопленка как фактор вирулентности возбудителей бронхопневмонии» содержит данные о механизмах формирования микробных сообществ, составе внеклеточного матрикса и роли персистентных клеток в обеспечении антибиотикорезистентности. В подразделе 1.3 проанализированы антибактериальные свойства коллоидного серебра и его способность

ингибировать адгезию микроорганизмов на слизистых оболочках. Подраздел 1.4 посвящен классификации и морфологии бактериофагов, а также описанию их литических циклов в контексте деструкции бактериальных клеток. В подразделе 1.6 рассмотрены технологические аспекты применения фаговых препаратов, включая методы стабилизации и преимущества аэрозольного способа введения. Подраздел 1.7 содержит сведения о системах противовирусного иммунитета бактерий, таких как CRISPR-Cas и системы рестрикции-модификации, ограничивающих эффективность фаготерапии. В подразделе 1.8 обобщены современные методологические подходы к поиску, выделению и селекции бактериофагов из объектов окружающей среды для создания терапевтических композиций.

Глава 2.2 «Результаты исследований и их обсуждение» включает 10 разделов, в которых последовательно изложены биологические свойства выделенных штаммов, методы их фаговой коррекции и расчет экономической эффективности предлагаемых мероприятий. В подразделах 2.2.1–2.2.3 представлены данные многолетнего мониторинга эпизоотического состояния хозяйств, позволившие установить доминирование грамотрицательных бактериальных ассоциаций в этиологии бронхопневмонии телят при стабильном уровне заболеваемости.

В разделе 2.2.4 отражена способность патогенов к биопленкообразованию, выявленная у большинства изолятов *Klebsiella pneumoniae* и *Mannheimia bovoculi*. Установлено, что применение бактериофагов в сочетании с коллоидным серебром значительно ингибирует этот процесс. Раздел 2.2.5 содержит анализ антибиотикорезистентности, подтвердивший высокую устойчивость кишечной палочки к традиционным препаратам при сохранении крайне низкой чувствительности к современным фторхинолонам и цефалоспорином, что обосновывает необходимость внедрения альтернативных средств контроля.

В подразделах 2.2.6–2.2.7 описана методология выделения литических бактериофагов из сточных вод животноводческих комплексов. Соискателем определена специфическая литическая активность выделенных фагов методами Грация и «spot-test», а также изучена динамика изменения морфологии их негативных колоний в процессе пассажирования на индикаторных культурах.

Раздел 2.2.8 посвящен апробации фаголизатов на модели индуцированной пневмонии лабораторных мышей, где ингаляционное введение препаратов обеспечило полную сохранность опытных групп по сравнению с контролем. В разделе 2.2.9 представлена разработанная схема интраназального применения фагосодержащих препаратов для телят, обеспечивающая купирование клинических признаков болезни и санацию носоглотки в течение короткого периода терапии.

В заключительном разделе 2.2.10 приводится расчет экономической эффективности ветеринарных мероприятий. На основании сопоставления затрат на лечение и предотвращенного ущерба установлен положительный экономический эффект. Высокий показатель эффективности на один рубль затрат как при монотерапии фагами, так и при использовании комплексной

схемы с серебром, подтверждает рентабельность и целесообразность внедрения разработанных протоколов в практику промышленного животноводства.

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. Каким образом в ходе эксперимента проводилась дифференциация истинного матрикса биопленки от избыточного капсульного экзополисахарида гипермукоидных штаммов при использовании метода окрашивания кристаллическим фиолетовым?

2. Проводилась ли электронная или конфокальная микроскопия для подтверждения наличия характерной трехмерной архитектоники биопленок, а не только факта адсорбции слизи на поверхности лунок?

3. Проводилась ли проверка на биологический антагонизм между бактериофагом и коллоидным серебром, и изучалось ли прямое влияние выбранной концентрации металла на стабильность белкового капсида фага при их совместном нахождении в препарате?

4. Каким методом, помимо фильтрации через 0,22 мкм и обработки хлороформом, осуществлялась очистка фаголизата от растворимых эндотоксинов (ЛПС), которые свободно проходят через мембранные фильтры и сохраняют высокую пирогенность?

5. Учитывалось ли наличие в конечном препарате активных бактериальных ферментов и экзополисахаридов, которые не инактивируются хлороформом и могут вызывать неспецифические реакции при ингаляционном введении в легкие?

6. Почему в дизайне эксперимента по оценке терапевтической эффективности отсутствовала контрольная группа животных, получавшая только раствор коллоидного серебра без бактериофага для разделения вклада каждого из компонентов?

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 Киянчук Маргариты Владимировны на тему: «Интраназальное применение бактериофагов при бронхопневмониях телят инфекционной этиологии» 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. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемых к кандидатской диссертациям,

а ее автор Киянчук Маргарита Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
доцент кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии
и ветеринарно-санитарной экспертизы
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Ульяновский государственный
аграрный университет имени П.А. Столыпина»,
г. Ульяновск

Феоктистова Наталья Александровна

адрес: 432017, Ульяновская область,
г. Ульяновск, Бульвар Новый Венец, 1.
Тел.: 8-8422-55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Подпись Феоктистовой Н.А. заверяю
и.о. первого проректора –
проректора по научной работе и
цифровой трансформации



И.И. Богданов