

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора ветеринарных наук, профессора Агольцова Валерия Александровича на диссертационную работу Хаммадова Наиля Ильдаровича на тему: «Омиксные исследования при разработке диагностических средств ветеринарного назначения», представленной в диссертационный совет 35.2.034.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Актуальность темы исследования

Инфекционные болезни животных наносят значительный ущерб здоровью животных, причиняют экономический ущерб, и в ряде случаев представляют угрозу для здоровья человека. Основой борьбы с заболеваниями, вызываемыми патогенными микроорганизмами, является точная и быстрая диагностика.

Согласно, данных Россельхознадзора, об эпизоотической ситуации в Российской Федерации у крупного рогатого скота, регулярно регистрируют лейкоз, бруцеллёз, лептоспироз, бешенство, инфекционный ринотрахеит, пастереллёз, эмфизематозный карбункул, хламидиоз, сальмонеллёз, колибактериоз, заразный узелковый дерматит, туберкулёз, парагрипп-3, вирусную диарею, листериоз, ящур и сибирскую язву. Для мелкого рогатого скота актуальны такие инфекционные болезни, как висна - маеди, артрит-энцефалит коз, оспа, бруцеллёз, инфекционный эпидидимит, контагиозно-пустулёзный дерматит, хламидиоз, лептоспироз, колибактериоз, анаэробная энтеротоксемия, бешенство, сальмонеллёз, микоплазмоз, пастереллёз, злокачественный отёк, браздот, листериоз и анаэробная дизентерия.

Диссертационная работа Хаммадова Н.И. посвящена разработке диагностических тест-систем, основанных на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, ИФА и ИХА, основанном на анализе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, позволяющем определить наиболее эффективные маркеры для выявления специфичных нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных заболеваний и постинфекционных антител

Для эффективной борьбы с инфекционными болезнями животных необходима разработка средств точной и быстрой диагностики, ключевым обстоятельством для этого является определение генетических и протеомных маркеров особо опасных, социально значимых и трансмиссивных инфекционных болезней животных, с использованием методов биоинформационного анализа, в связи с чем тема исследований соискателя представляется крайне актуальной.

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

Соискателем определены специфические генетические маркеры для индикации нуклеиновых кислот возбудителей туберкулёза, бруцеллёза, боррелиоза, сибирской язвы, клещевого энцефалита, ящура, инфекционного ринотрахеита, вирусной диарей, парагриппа-3, классической чумы свиней, болезни Ауески. Определены протеомные маркеры возбудителей бруцеллёза, туберкулеза и артрита-энцефалита коз для серологической диагностики этих болезней, и разработаны соответствующие способы их индикации. Исследования, представленные в диссертации, соответствуют современному уровню проведению анализа. Обоснованность и достоверность полученных данных подтверждены воспроизводимостью результатов и объёмом экспериментальных исследований. Полученные в результате исследований данные всесторонне проанализированы, что позволило автору диссертации сформулировать соответствующие задачам исследования основные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации.

Таким образом, выдвинутые соискателем научные положения, выводы и рекомендации отвечают поставленной цели и задачам, соответствуют содержанию диссертации, аргументированы и обоснованы результатами собственных исследований.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

Для выполнения поставленных задач использованы общедоступные ресурсы национального центра биотехнической информатизации, база иммуногенных эпитопов. Биоинформационный анализ выполнялся с использованием специализированного программного обеспечения. Все геномные, протеомные и серологические исследования выполнены с применением современных методов и на современном оборудовании (проходящем ежегодную поверку). Достоверность исследования определяется тем, что полученные методами биоинформатики данные подтверждаются анализом фактического материала, достаточным объёмом выборки анализируемого материала и статистической обработкой результатов.

Научная новизна исследований заключается в том, что диссертантом определены специфичные нуклеотидные последовательности для вирусов – клещевого энцефалита, ящура, парагриппа-3, вирусной диарей, инфекционного ринотрахеита; бактерий родов – *Mycobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Borrelia* и выполнен дизайн олигонуклеотидных затравок для амплификации генетических маркеров.

Отработаны способы получения нативных антигенов из штамма *Mycobacterium bovis bovinus* – 8 для применения при обнаружении противотуберкулёзных антител методом ИФА.

Определены иммунодоминантные антигены и иммуногенные эпитопы возбудителей бруцеллёза, вируса артрита-энцефалита коз и туберкулёза, на

основе которых получены антигены для выявления антител против данных микроорганизмов.

Разработан алгоритм омиксных исследований для создания средств диагностики инфекционных болезней животных.

Практическая реализация результатов диссертационной работы

В результате выполнения диссертационного исследования диссертантом разработаны (получены декларации соответствия) тест-системы для серологической индикации антител методом ИХА и ИФА к возбудителю туберкулёза в сыворотке или плазме крови крупного рогатого скота, для индикации возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески методом полимеразной цепной реакции, а так же разработаны способы индикации нуклеиновых кислот вирусов – клещевого энцефалита, ящура, парагриппа-3, вирусной диарей, инфекционного ринотрахеита и бактерий родов – *Mycobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Borrelia*, способы определения антител против возбудителей бруцеллёза и вируса артрита-энцефалита коз, которые могут быть использованы для лабораторной диагностики ряда особо опасных, трансмиссивных, социально и экономически значимых инфекционных болезней животных.

Результаты проведенной научно-исследовательской работы отражены также в нормативно технической документации: Технические условия «Тест-система «Туберкулёз ИХА», предназначенная для серологической индикации антител методом ИХА к возбудителю туберкулёза в сыворотке или плазме крови крупного рогатого скота» (ТУ 21.10.60-003-00492374-2023); Технические условия «Тест-система «ТУБЕРКУЛЁЗ КРС ИФА» для серологической индикации антител животных против туберкулеза» (ТУ 21.10.60-007-00492374-2020); Технические условия «Тест-система «КЧС, АУЕСКИ ОТ-ПЦР-РВ» для индикации возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески» (ТУ 21.10.60-004-00492374-2025).

Часть исследований выполнялась по заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. По результатам исследований составлены и утверждены следующие отчёты о НИР: «Биологическая безопасность»; «Лабораторные и производственные испытания мультиплексных тест-систем для индикации и идентификации различных видов микроорганизмов»; «Разработка мультипробирочной ПЦР тест-системы для диагностики инфекционных болезней животных»; «Лабораторные и межлабораторные испытания серологической тест-системы для диагностики туберкулеза животных»; «Разработка ИХА – теста для выявления специфических антител к *Mycobacterium bovis* в сыворотке крови животных»; «Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для диагностики классической чумы свиней и болезни Ауески».

Полученные результаты диссертации представляют несомненный научный и практический интерес

Соответствие диссертации, автореферата и публикаций критериям «Положения о порядке присуждения учёных степеней»

Диссертация изложена на 392 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и обсуждения собственных исследований, заключение, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов, список используемых источников, список иллюстрируемого материала, приложения. Диссертация иллюстрирована 91 рисунком и 38 таблицами. Список литературы включает 519 источников, в том числе 398 отечественных и 121 на иностранных языках. Диссертация соответствует критериям «Положения о порядке присуждения учёных степеней». Диссертационная работа по своему содержанию соответствует паспорту научной специальности: 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных, пунктам 4, 7, 11, 13, 15, 16 и 19.

Автореферат, изложен на двух условных печатных листах, содержит основные разделы диссертации и раскрывает её научные положения. Выводы и практические предложения в автореферате и диссертации идентичны. Автореферат диссертации также соответствует критериям «Положения о порядке присуждения учёных степеней».

По материалам диссертации опубликовано 39 печатных работ, из которых в рецензируемых изданиях, входящих в перечень рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации – 13 статей, в журналах, входящих в международные базы (Web of Science и Scopus) – 9 статей, в материалах международных конференций – 10 статей. Получено 3 патента на изобретение.

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что, диссертационная работа выполнена, с использованием современных методов исследования.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Хаммадовым Наилем Ильдаровичем диссертационное исследование организовано и проведено самостоятельно. В диссертационной работе сделан глубокий анализ состояния изучаемой соискателем темы, поставлены цель и задачи научного исследования, обоснован выбор материалов и методов, проведён анализ сравнительных данных, сформулированы основные положения и выводы. Цифровой материал сведен в таблицы и проанализирован. На всех этапах проведения исследований автор принимал непосредственное участие. Репрезентативность полученных материалов не вызывает сомнений. Диссертационная работа написана и оформлена лично автором, опубликованные результаты подтверждают её существенный вклад в решение поставленных научных задач.

Оценка содержания диссертации, её завершенности

Автором во «Введении» обоснована актуальность темы, определён предмет исследования, сформулирована цель, задачи исследования, новизна, теоретическая и практическая значимость работы. На основании этого логически вытекают научные положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» автор обобщает результаты исследований относительно диагностики инфекционных болезней животных и методов биоинформатики, способствующих разработке средств их специфичной диагностики. Литературный обзор составлен с учётом направленности исследований.

Материалы и методы использованные автором диссертации описаны подробно, с указанием объектов, оборудования, методик и программ.

В результатах и обсуждениях собственных исследований описана разработка способов индикации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных заболеваний крупного рогатого скота, разработка способов индикации нуклеиновых кислот возбудителей заболеваний, представляющих экономическую и социальную угрозу, разработка способов индикации нуклеиновых кислот возбудителей трансмиссивных инфекций.

Описывая применение средств дифференциации возбудителей инфекционных заболеваний одного биологического вида выполнен анализ полиморфизма нуклеиновых кислот возбудителей туберкулёза и сибирской язвы, для дифференциации различных их штаммов, а также анализ полиморфизма нуклеиновых кислот вируса бешенства, позволяющий оценить не произошли ли у штамма вируса мутации в иммунологически значимых участках генома.

В разделе диссертации, посвященном разработке способов индикации иммунного ответа животных на присутствие в организме возбудителей инфекционных заболеваний описан ряд различных подходов к получению антигенов для их применения в серологических реакциях. Так диссертант выполнил дизайн синтетического пептида и представил способ индикации иммунного ответа на инфицирование бруцеллами, основанного на применении синтетического антигена. Другой выполненный автором подход к получению диагностического антигена заключается в получении рекомбинантных антигенов для выявления иммунного ответа на инфицирование бруцеллами и вируса артрита-энцефалита коз с разработкой способов индикации иммунного ответа на инфицирование соответствующими патогенными микроорганизмами. Третий подход заключался в разработке способов индикации иммунного ответа, основанного на применении нативных антигенов возбудителей туберкулёза.

Завершается диссертационное исследование описанием алгоритма омиксных исследований при разработке средств диагностики инфекционной патологии сельскохозяйственных животных.

В целом проведенный анализ диссертационной работы Хаммадова Наиля Ильдаровича позволяет констатировать, что исследования соискателя представляет собой завершённый научный труд.

Замечания, предложения и вопросы по диссертации

Принципиальных замечаний по представленной диссертационной работе нет, однако на несколько вопросов хотелось бы получить разъяснения от автора:

- Опишите в чем основное преимущество изотермической амплификации перед классическим термоциклированием?
- Среди полученных рекомбинантных антигенов описаны антигены, способные выявить иммунный ответ против R-формы бруцелл и антиген, способный выявить антитела против S- и R-форм бруцелл. Есть ли прикладное преимущество от применения обоих антигенов?
- В ИХА визуализация серологической реакции основана на применении наночастиц коллоидного золота. Какой срок сохранения функциональной активности конъюгата антивидовых антител с наночастиц коллоидного золота в вашем случае?
- Учитывая, что одной из самых чувствительных реакций является ИФА, какое функциональное преимущество может быть у ИХА?
- При определении длины ампликона (при VNTR-анализе) в ряде случаев встречаются короткие повторы (как pOX1 в вашей работе) какими способами можно точно определить их количество?
- В работе, для выявления иммунного ответа применялись антигены величиной от 33 до 441 аминокислотных оснований. Какое минимальное число аминокислот нужно для связывания с антителом?

Указанные вопросы носят дискуссионный характер, не снижают научно-практическую значимость диссертационной работы и не влияют на её общую положительную оценку.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Диссертационная работа Хаммадова Наиля Ильдаровича на тему: «Омиксные исследования при разработке диагностических средств ветеринарного назначения» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне с применением современных методов исследований, которая базируется на полученных лично соискателем данных, обобщённых в заключении и выводах, а её содержание является решением научной задачи по разработке и оптимизации комплексных омиксных молекулярно-биологических подходов для выявления специфических генетических и протеомных маркеров возбудителей инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и созданию на их основе высокоэффективных средств диагностики инфекционных болезней животных.

Диссертация написана автором самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, что свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку. Полученные результаты имеют теоретическое и практическое значение.

На основании анализа материалов, изложенных в диссертации, считаю, что представленная работа по актуальности, новизне, научной и практической значимости отвечает требованиям пунктов 9-11, 13 и 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а её автор,

Хаммадов Наиль Ильдарович, заслуживает присуждения ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных.

Почтовый адрес: 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина зд. 4, стр. 3.
Тел.: +7 (8452) 23-32-92
E-mail: rector@sgau.ru

Официальный оппонент:

Профессор кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза», ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова», доктор ветеринарных наук, профессор

Агольцов

Валерий Александрович

Подпись В.А. Агольцова заверяю:

Учёный секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО Вавиловский университет

Марадудин

Алексей Максимович

« 29 » июня 2026 г.

