

ОТЗЫВ

официального оппонента 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. Тема диссертационной работы Хаммадова Н.И. посвящена актуальному направлению исследований – применению геномики, протеомики и метаболомики при разработке диагностических тест-систем, основанных на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, иммуноферментном анализе и иммунохроматографическом анализе. Диагностика патогенных микроорганизмов на современном этапе научного развития включает в себя всесторонний анализ определяемых биомаркеров, основой которого является биоинформационный анализ, как геномный (геномика), так и протеомный (протеомика), которые в совокупности с транскриптомикой и метаболомикой представляют омиксные исследования.

Анализ генетического кода микроорганизмов является самым эффективным методом идентификации их принадлежности к роду, виду и даже штамму. Кроме индикации генетического материала искомого микроорганизма по консервативным локусам, свойственным для данного вида или рода, в практической работе полезен поиск сопутствующих биомаркеров, которые можно использовать для контроля правильности выделения нуклеиновых кислот.

Другим, широко применяемым, методом выявления инфицирования животных патогенными микроорганизмами является определение антител против конкретных возбудителей инфекционных заболеваний. Одной из наиболее удобных в исполнении, специфичных и чувствительных

серологических реакций является иммуноферментный анализ (ИФА). Анализируя наличие в крови животных антител, можно определить не только явно текущий инфекционный процесс, но и выявить латентные инфекции.

Тема диссертационной работы по разработке диагностических тестов для выявления животных, инфицированных возбудителями особо опасных, трансмиссивных и социально значимых инфекционных заболеваний с применением методов биоинформационного анализа является актуальной и важной для современной ветеринарной науки и практики.

Таким образом, основываясь на особенностях выполнения биоинформационного анализа в области геномики, протеомики и транскриптомики целью научных исследований диссертационной работы Хаммадова Н.И. являлась разработка и оптимизация комплексных омиксных молекулярно-биологических подходов для выявления специфических генетических и протеомных маркеров возбудителей инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и создания на их основе высокоэффективных средств диагностики инфекционных болезней животных. Для достижения цели диссертантом поставлены 8 задач.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Методические подходы, использованные автором, отвечают высокому уровню современных исследований. Обоснованность и достоверность полученных данных подтверждены воспроизводимостью результатов и объёмом экспериментальных исследований. Полученные в результате экспериментальной работы научные данные обобщены и всесторонне проанализированы, что позволило сформулировать выносимые на защиту основные научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, которые отражают основные достижения и результаты проведенной Хаммадовым Н.И. экспериментальной работы.

Научная новизна работы. Диссертантом определены специфичные нуклеотидные последовательности для вирусов – клещевого энцефалита, ящура, парагриппа-3, вирусной диарей, инфекционного ринотрахеита и бактерий родов – *Mycobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Borrelia*.

Основываясь на полиморфизме геномов искомым и близких по нуклеотидному составу организмов выполнен дизайн олигонуклеотидных затравок для амплификации генетических маркеров.

Разработаны способы получения нативных антигенов из бактерий вида *Mycobacterium bovis*, штамм *Bovinus* – 88 для применения при индикации 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 описанных средств диагностики инфекционной патологии сельскохозяйственных животных, позволяющий в ходе поиска генетических и серологических маркеров выбрать наиболее результативный порядок действий выполняемого анализа.

Практическая значимость и использование полученных результатов. Разработанные диссертантом диагностические тесты, в комплексе с другими диагностическими подходами могут быть использованы для лабораторной диагностики ряда особо опасных, трансмиссивных, социально и экономически значимых инфекционных болезней животных.

По результатам исследований составлена нормативно техническая документация: Технические условия «Тест-система «Туберкулёз ИХА», предназначенная для серологической индикации антител методом иммунохроматографического анализа (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).

Ряд исследований выполнялись по заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. По результатам исследований составлены и утверждены следующие отчёты о НИР: «Биологическая безопасность» (ЕГИСУ НИОКТР № АААА-Б20-220020590202-6); «Лабораторные и производственные испытания мультиплексных тест-систем для индикации и идентификации различных видов микроорганизмов» (ЕГИСУ НИОКТР № 121020400123-0); «Разработка мультипробирочной ПЦР тест-системы для диагностики инфекционных болезней животных» (ЕГИСУ НИОКТР № 121020400115-5); «Лабораторные и межлабораторные испытания серологической тест-системы для диагностики туберкулеза животных» (ЕГИСУ НИОКТР № 221031200190-9); «Разработка ИХА – теста для выявления специфических антител к *Mycobacterium bovis* в сыворотке крови животных» (ЕГИСУ НИОКТР № 222012800114-7); «Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для диагностики классической чумы свиней и болезни Ауески» (ЕГИСУ НИОКТР 1022070500033-3).

Практическая значимость исследований выражается как в раскрытии особенностей биоинформационного анализа, что делает эту важную, при разработке средств генетической и серологической диагностики, область знаний более доступной широкому кругу научных исследователей, так и в представлении созданных в ходе исследования средств индикации генетических маркеров инфекционных заболеваний и способов выявления антител против возбудителей туберкулёза, бруцеллёза и вируса артрита-энцефалита коз.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность представленных в диссертационном исследовании данных подтверждается использованием соответствующего поверенного высокотехнологического оборудования, а также строгим соблюдением последовательности действий, что позволило получить объективные анализируемые данные и подтвердить функциональную состоятельность представленных способов диагностических исследований. Биоинформационный анализ выполнялся с использованием специализированного программного обеспечения.

Основные положения диссертационного исследования были предметом докладов и обсуждений на ежегодных отчётах о научно-исследовательской работе и следующих научных конференциях: Proceedings of the VI International M. bovis Conference – 2014 (Wales, Ireland); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, Россия); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, Белорусия); Международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» – 2018 (Казань, Россия); Республиканской конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения В. А. Бандарина «Физико-химическая биология как основа современной медицины» – 2019 (Минск, Белорусия); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (Москва, Россия); X юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» – 2021 (Москва, Россия); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности» – 2023 (Казань, Россия); XXIII Международной научно-практической конференции «Современные научно-практические достижения в ветеринарии» – 2024 (Киров, Россия); Конгрессе с международным участием

«Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2024» (Москва, Россия); XVIII Международной научно-практической конференции «Научные основы повышения продуктивности, здоровья животных и продовольственной безопасности», посвященной 55-летию ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии» – 2024 (Краснодар, Россия).

Оценка содержания, завершенности работы и качества её содержания. Диссертационная работа Хаммадова Н.И. по своему содержанию соответствует паспорту научной специальности: 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных, пунктам 4, 7, 11, 13, 15, 16 и 19.

Представленная диссертационная работа оформлена по общепринятому плану в виде одного тома. Титульный лист соответствует установленным требованиям. Диссертация 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. Общий объём диссертационной работы составляет 392 страницы, включает 91 рисунок и 38 таблиц. Список литературы включает 519 источников, в том числе 398 отечественных и 121 на иностранных языках.

Публикации. Основные научные результаты диссертационной работы опубликованы в 39 печатных работах, 13 из которых опубликованы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 9 статей в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (Web of Science и Scopus) и трёх патентах.

Во «Введении» автор мотивированно обосновывает актуальность темы исследования, логично формирует цель, задачи, описывает степень

разработанности проблемы, обобщает основные положения, выносимые на защиту, формулирует научную новизну и практическую значимость.

В главе «Обзор литературы» автор освещает эпизоотическую ситуацию в Российской Федерации, акцентируя внимание на наиболее распространённых заболеваниях сельскохозяйственных животных инфекционной природы. При описании эпизоотической ситуации автор в том числе перечисляет количество неблагополучных пунктов и число заболевших животных в порядке убывания. Кроме того, автор достаточно детально описал какие среди сельскохозяйственных животных встречаются патогенные микроорганизмы вирусной природы и их особенности. Аналогичным образом были описаны патогенные микроорганизмы бактериальной и грибковой природы. Автор так же описал какими инфекциями есть риск заразиться специалистам, работающим в сельскохозяйственной отрасли. Завершение главы «Обзор литературы» посвящено методам определения патогенных микроорганизмов, методам биоинформатики, применяемым при разработке средств индикации патогенных микроорганизмов, после чего автор предоставил заключение по обзору литературы.

В главе 2 «Основная часть» автор описывает два основных раздела – «материалы и методы исследования» и «результаты и обсуждения собственных исследований». В разделе «Материалы и методы исследований» автор описывает методические подходы и материалы, применённые при разработке способов индикации нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов и дифференциации их штаммов, а также аналогичную информацию, применяемую при разработке способов индикации иммунного ответа при инфицировании животного. При этом автор описывает какие ресурсы и материалы использовались в работе, какое автор применял программное обеспечение и какие именно методы работы использовал.

Раздел результаты и обсуждения собственных исследований содержит три обособленных подраздела 2.2.1 «Разработка способов индикации нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов», 2.2.2 «Применение

средств дифференциации возбудителей инфекционных заболеваний одного биологического вида» и 2.2.3 «Разработка способов индикации иммунного ответа животных на присутствие в организме возбудителей инфекционных заболеваний».

В подразделе диссертации, посвященном разработке способов индикации нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов детально 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 (клещевого энцефалита и боррелиоза).

В подразделе диссертации, посвященном применению средств дифференциации возбудителей инфекционных заболеваний одного биологического вида описан анализ полиморфизма нуклеиновых кислот возбудителей туберкулёза и сибирской язвы, для дифференциации различных их штаммов, а также анализ полиморфизма нуклеиновых кислот вируса бешенства, для подтверждения его таксономической принадлежности.

В подразделе диссертации, посвященном разработке способов индикации иммунного ответа животных на присутствие в организме возбудителей инфекционных заболеваний описана разработка способов индикации иммунного ответа на инфицирование бруцеллами, основанного на применении синтетического антигена, рекомбинантных антигенов (короткого, включающего иммуногенные эпитопы на которые формируется В-клеточный иммунный ответ и цельного О-антигена), разработка способов индикации иммунного ответа основанного на применении рекомбинантного антигена гена *env* вируса артрита-энцефалита коз, а также разработка способов индикации иммунного ответа, основанного на применении нативных антигенов возбудителей туберкулёза.

Каждый подраздел результатов исследований заканчивается заключением к разделу, а более крупные разделы (2.2.1, 2.2.2 и 2.2.3) заканчиваются соответствующими обсуждениями полученных результатов.

Заключение рецензируемой работы изложено в форме подведения итогов исследования, формирования выводов в соответствии с поставленными задачами исследования, практических предложений и рекомендаций. Выводы сформулированы логично и вытекают из содержания диссертационной работы.

Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертационной работы. Диссертация и автореферат соответствуют требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (от 24.09.2013 г. № 842).

Представленная диссертационная работа Хаммадова Н.И. является самостоятельной законченной научной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок представлен алгоритм омиксных исследований применяемый при разработке диагностических средств для выявления ряда инфекционных болезней животных.

В целом положительно оценивая диссертационную работу Хаммадова Н.И., подчёркивая высокую теоретическую и практическую значимость, хотелось уточнить отдельные вопросы, возникшие в ходе рецензирования данной работы.

Вопросы.

1. В диссертационной работе описан общий алгоритм омиксных исследований применяемый при разработке ПЦР-тестов и серологических тестов для определения специфических антител. Указанный алгоритм справедлив только для представленных в диссертации патогенов или он актуален для любого патогенного микроорганизма?

2. При разработке диагностических тестов для выявления антител против возбудителей инфекционных заболеваний, если в лаборатории нет

широкой линейки специализированного оборудования, какой подход для производства таких тестов Вы порекомендуете?

Пожелания и замечания.

1. Опишите основные риски применения в полимеразной цепной реакции олигонуклеотидных праймеров последовательность которых заимствована из научных статей.

2. В работе вы описываете различные варианты выполнения ПЦР, в том числе два варианта ПЦР в реальном времени. Опишите особенности выполнения реакции с применением технологии TaqMan и ПЦР с применением интеркалирующих агентов.

3. В представленной работе Вы описываете сопутствующие генетические маркеры, позволяющие проводить внутренний контроль амплификации, который позволяет проводить контроль правильности выделения нуклеиновых кислот и правильность составления реакционной смеси. Опишите как выполнить такой контроль в случае проведения ОТ-ПЦР, как проконтролировать в том числе успешность выполнения обратной транскрипции.

Указанные вопросы носят дискуссионный и уточняющий характер, не снижают научную и практическую значимость работы и не влияют на её общую положительную оценку.

Заключение

Диссертационная работа Хаммадова Наиля Ильдаровича на тему «Омиксные исследования при разработке диагностических средств ветеринарного назначения» является завершённой научно-квалификационной работой с научным и прикладным значением, в которой успешно решены поставленные задачи и достигнута актуальная для ветеринарной медицины цель. По актуальности, научной новизне и практической значимости, объёму

проведенных исследований, обоснованности положений и выводов диссертационная работа соответствует критериям пп. 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.

Официальный оппонент:

Доктор ветеринарных наук, профессор
главный научный сотрудник отдела
координации научно-исследовательских
работ ФГБУ «ВНИИЗЖ»,



Белоусов Василий Иванович

Подпись Белоусова В.И. заверяю:

Начальник отдела координации НИР
ФГБУ «ВНИИЗЖ», канд. биол. наук



А.А. Разумова

Контактные данные

Почтовый адрес: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Телефон: +7(4922)26-06-14
e-mail: arriah@fsvps.gov.ru
+7(495) 700 01 37; 8 903 191 69 76