

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»,
доктор ветеринарных наук, профессор,
член-корреспондент Российской академии наук

С.В. Позябин



29 июня

2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» на диссертационную работу Хаммадова Наиля Ильдаровича на тему «Омиксные исследования при разработке диагностических средств ветеринарного назначения», представленную к защите 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 научной специальности 4.2.3 - Инфекционные болезни и иммунология животных

Актуальность избранной темы. Актуальность диссертационного исследования Хаммадова Наиля Ильдаровича обусловлена необходимостью диагностики патогенных микроорганизмов различного происхождения, вызывающих заболевания сельскохозяйственных животных и птицы. Данная диагностика содержит в себе всесторонний анализ определяемых биомаркеров – биоинформационный анализ, как геномный (геномика), так и протеомный (протеомика). Вместе с исследованиями РНК (транскриптомика) и метаболитов (метаболомика), эти подходы формируют так называемые "омиксные" исследования, позволяющие получить всестороннее представление о биологических системах.

Генетический код каждого живого организма уникален и служит основой для его видовой принадлежности и ключевых характеристик. В сельском хозяйстве анализ нуклеотидного состава генома сельскохозяйственных животных позволяет выявлять хозяйственно значимые признаки и потенциально опасные "летальные гены". Для микроорганизмов же генетический анализ является наиболее надежным методом их таксономической классификации, позволяя определить род, вид и даже штамм. Таким образом, генетический код микроорганизма выступает в роли его "генетического паспорта". Помимо идентификации целевого микроорганизма по

консервативным участкам ДНК, характерным для его рода или вида, часто применяются вспомогательные биомаркеры. Например, при диагностике лейкоза крупного рогатого скота проводится определение ДНК КРС, что служит для контроля правильности выделения нуклеиновых кислот. Помимо прочих диагностических методов, значимым является оценка иммунного ответа организма на антигены возбудителей инфекционных заболеваний. В настоящее время иммуноферментный анализ (ИФА) признан одной из наиболее эффективных серологических методик, отличающейся удобством выполнения, высокой специфичностью и чувствительностью. Исследование сыворотки крови животных на предмет наличия антител позволяет не только подтвердить активную фазу инфекции, но и диагностировать хронические или латентные формы болезни.

Представленное исследование имеет высокую актуальность, поскольку напрямую поддерживает реализацию приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации. В частности, оно соотносится с пунктом 20, подпунктом «г», который предусматривает переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработку и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективную переработку сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания. Фундаментальное значение для разработки специфических методов генетической и серологической диагностики инфекционных заболеваний имеет анализ генома и аминокислотных последовательностей антигенов патогенных микроорганизмов.

Все изложенное обосновывает актуальность темы рассматриваемой диссертации, посвященной 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.

Содержание работы. Представленная соискателем работа построена по традиционному плану, изложена на 392 страницах компьютерного текста. Состоит из введения; обзора литературы; материалов и методов исследований; результатов исследований и обсуждения; заключения; списка сокращений и условных обозначений; словаря терминов; списка использованных источников; списка иллюстративного материала; приложения. Список литературы состоит из 519 источников, из которых 121 иностранных. Работа иллюстрирована 38 таблицами и 91 рисунком. В приложении представлены копии нормативно-технической документации: на тест-систему «ТУБЕРКУЛЁЗ КРС ИФА» для серологической индикации антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) к возбудителю туберкулеза (*M. bovis*) в сыворотке или плазме крови крупного рогатого скота; на тест-систему «Туберкулёз ИХА» предназначенную для серологической индикации антител методом иммунохроматографического анализа (ИХА) к возбудителю туберкулёза в сыворотке или плазме крови крупного рогатого скота; на тест-систему «КЧС, АУЕСКИ ОТ-ПЦР-РВ» для индикации возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески, а также копия диплома I степени XXVI Российской агропромышленной выставки «Золотая осень-2024» «За разработку и производство тест-системы ИФА для серологической диагностики аденовирусной инфекции

крупного рогатого скота», «За разработку и производство тест-системы «Туберкулёз ИХА», предназначенной для серологической индикации антител методом иммунохроматографического анализа (ИХА) к возбудителю туберкулёза в сыворотке или плазме крови крупного рогатого скота», что подтверждает практическую значимость работы.

Во введении диссертант обосновывает выбор темы, ее актуальность, определяет цель и задачи исследования, формулирует ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость.

В обзоре литературы автор приводит перечень наиболее распространенных в Российской Федерации заболеваний сельскохозяйственных животных инфекционной природы, описывает особенности патогенных микроорганизмов бактериальной, вирусной и грибковой природы, указывает инфекционные заболевания, с которыми могут столкнуться специалисты, работающие в сельском хозяйстве, характеризует методы определения патогенных микроорганизмов в исследуемом материале, а также приводит классификацию биоинформационных исследований в разработке средств индикации патогенных микроорганизмов.

Согласно анализу научной литературы, подавляющее большинство коммерчески доступных диагностических наборов и рекомбинантных вакцин характеризуются отсутствием раскрытия специфики их производства. Более того, процессы биоинформатического анализа и конструирования олигонуклеотидов, пептидов и векторов, предназначенных для трансформации (трансфекции) микроорганизмов, остаются не детализированными. Вследствие этого, представляется целесообразным освещение особенностей биоинформатического анализа при решении задач в рамках геномных, постгеномных и протеомных направлений, что, в свою очередь, приведет к разработке ряда методик диагностики инфекционных заболеваний.

В разделе **«Материалы и методы исследований»** дано описание методических подходов и материалов, применённых при разработке способов индикации нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов и дифференциации их штаммов, при разработке способов индикации иммунного ответа при инфицировании животного, представлены классические и новые методики, которыми руководствовался автор при проведении испытаний. В этих разделах автор также приводит описание опытов, характеристики программного обеспечения и ресурсов для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, особенностей работы с биологическим материалом, получения использованных в работе антигенов и антител.

В разделе **«Результаты и обсуждение собственных исследований»** представлены результаты по разработке способов индикации нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов. В частности, автор проводил определение генетического маркера для индикации нуклеиновых кислот возбудителя инфекционного ринотрахеита, возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота, возбудителя парагриппа-3. Для определения нуклеотидной последовательности разработанных праймеров и зондов для генетической идентификации возбудителей инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 диссертант использовал метод BLAST-анализа. Помимо этого, выполнялась реализация способа индикации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных заболеваний крупного рогатого скота в мультиплексном формате.

Для выполнения данного пункта диссертационной работы диссертантом использовался метод мультиплексной ПЦР.

Хаммадовым Н.И. проводилась разработка способов индикации нуклеиновых кислот возбудителей заболеваний, представляющих экономическую и социальную угрозу – возбудителя ящура, возбудителя туберкулёза, возбудителя бруцеллёза, возбудителя сибирской язвы, возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески, а также возбудителей трансмиссивных инфекций (клещевого энцефалита и боррелиоза), с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции и ПЦР в режиме реального времени. Выполнялась разработка способов индикации бруцелл путём специфической амплификации. Проводился анализ полиморфизма нуклеиновых кислот вируса бешенства, для подтверждения его таксономической принадлежности, разработка способов индикации иммунного ответа животных на присутствие в организме возбудителей инфекционных заболеваний (на примере бруцелл и возбудителей туберкулёза).

Значительным достижением диссертанта является то, что ему удалось разработать 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.

В разделе «Заключение» диссертантом обобщены полученные данные и проведен сравнительный анализ с результатами других авторов.

Таким образом, полученные диссертантом результаты исследований, могут служить подтверждением возможности выполнения омиксных исследований для диагностики инфекционных патологий сельскохозяйственных животных. При работе с относительно короткими нуклеотидными последовательностями возбудителей инфекционных болезней (до 10-20 тысяч пар нуклеотидов) процесс анализа включает следующие шаги: сначала проводится сравнение полной геномной ДНК искомого микроорганизма с известными последовательностями. Затем определяется, насколько похож интересующий исследователя маркерный участок ДНК на другие, не связанные напрямую последовательности. На основе этого сходства разрабатываются и тестируются специальные короткие фрагменты ДНК (праймеры и зонды), которые будут использоваться для дальнейших исследований. При анализе нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных болезней с большим размером генома (более 10-20 тысяч пар нуклеотидов) осуществляется поиск специфических коротких участков ДНК, характерных для искомого микроорганизма. Далее анализируемый участок ДНК сравнивается с соответствующими участками ДНК как у родственных, так и у других организмов. На основе этого сравнения разрабатываются и проверяются праймеры и зонды, предназначенные для точного выделения (амплификации) нужного маркерного участка ДНК. Важным этапом является проверка того, насколько разработанные олигонуклеотиды (праймеры и зонды) специфичны именно к целевому участку. Анализ аминокислотных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний отличается от состава нуклеотидных последовательностей и включает в себя определение антигенного профиля (выявление всех белков (антигенов), присутствующих в анализируемом микроорганизме); идентификацию ключевых антигенов (поиск наиболее важных антигенов, вызывающих иммунный ответ (иммунодоминантных) и определение их активных участков (иммуногенных эпитопов); оценку иммунного ответа (анализ

того, как организм реагирует на эти антигены); структурный анализ (выявление участков белка, отвечающих за его расположение в клеточной мембране (трансмембранные домены), мест присоединения сахаров (сайты гликозилирования) и сигналов для экспорта из клетки (сигнальные пептиды); отбор и оптимизацию (оценку специфичности белков и выбор тех, которые обладают наилучшими характеристиками. При необходимости, проводится корректировка физических свойств белка); рекомбинантный синтез (при необходимости добавление необходимых "технических" последовательностей и оптимизация кодонов (для более эффективного производства белка в клетках); получение и проверку (целевой белок, получившийся в результате, проходит проверку на соответствие).

Работа завершается выводами, которые логически вытекают из результатов выполненной работы, практическими предложениями и перспективами дальнейшей разработки темы.

Научная новизна. Как отмечается в диссертации, определены специфические нуклеотидные последовательности для вирусов – клещевого энцефалита, ящура, парагриппа-3, вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита; бактерий родов – *Mycobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Borrelia*; цитокинов свиней – интерферона гамма и фактора некроза опухоли и организмов с частичной гомологией генома (по результатам BLAST-анализа).

На основании полиморфизма геномов искоемых и близкородственных организмов, сходных по нуклеотидному составу, для каждого генетического маркера индивидуально был разработан дизайн олигонуклеотидных праймеров, предназначенных для амплификации соответствующих маркеров.

Успешно созданы методики получения естественных антигенов из штамма Bovinus – 88 бактерии *Mycobacterium bovis*. Эти антигены предназначены для использования в иммуноферментном анализе (ИФА) с целью выявления антител, указывающих на наличие туберкулёза.

В ходе исследований диссертанта были идентифицированы наиболее важные антигены и их иммуногенные эпитопы у патогенов, вызывающих бруцеллёз, артрит-энцефалит коз и туберкулёз. Эти данные легли в основу разработки антигенов для диагностики антител к данным заболеваниям.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исходя из представлений о том, что предлагаемый диссертантом алгоритм омиксных исследований способствует упрощенному пониманию процесса анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, обоснована возможность самостоятельного анализа состоятельности представленных в научных публикациях генетических маркеров, а также выполнения поиска и дизайна олигонуклеотидных праймеров и последовательностей для экспрессии желаемого белка в про- и эукариотических системах экспрессии.

Практическая значимость работы подтверждена методическими рекомендациями, нормативно технической документацией, отчётами о НИР (по тематическим заданиям МСХ РФ).

Итогом проведенных диссертантом исследований стало создание методических рекомендаций, изложенных ниже: «Индикация и дифференциация нуклеиновых кислот возбудителей респираторных заболеваний (ИРТ, РСИ, ПГ-3 и

ВД) крупного рогатого скота», «Идентификация и дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* молекулярно-генетическими методами».

По результатам исследований составлена нормативно-техническая документация: Технические условия «Тест-система «Туберкулёз ИХА», предназначенную 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).

Часть исследований выполнялось по заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации - Департамент образования, научно-технологической политики и рыбохозяйственного комплекса, 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 проведенных исследований проявляется в двух ключевых аспектах:

Во-первых, исследования способствуют более глубокому пониманию биоинформационного анализа, тем самым расширяя доступ к этой важной для создания генетических и серологических диагностических методов области знаний для научного сообщества.

Во-вторых, в рамках данной работы представлены конкретные инструменты для обнаружения генетических и протеомных маркеров инфекционных заболеваний.

По материалам диссертационной работы получены патенты (№2023110770 от 10.01.2024; № 2021111909 от 03.02.2022; № 2668829 от 10.09.2013) на изобретение (Способ получения антигена из *Mycobacterium bovis* Bovinus-8 штамм 700201 молекулярной массой 24 кДа для изучения гуморального иммунного ответа; Набор высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для детекции и дифференциации нетуберкулезных микобактерий; Способ проведения аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам АА, КК и АК гена фермента диацетил-глицерин о-ацетил трансферазы для определения наследуемости жирномолочности).

Апробация результатов исследования и публикация работ. Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на ежегодных отчётах о НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (2012 – 2021 гг. Казань, Россия).

Научные достижения, полученные в ходе диссертационного исследования, были представлены на ряде профильных конференций: 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).

Личный вклад автора. Автор внес существенный личный вклад в исследование, охватывающий его планирование, отбор образцов, а также проведение всех биоинформационных и диагностических работ. Он самостоятельно осуществил все биоинформатические анализы и лабораторные исследования. Кроме того, автор активно участвовал в подготовке научных публикаций, патентов, докладов для конференций, а также в лабораторных испытаниях и разработке нормативной документации для производства диагностических наборов. Часть результатов была получена и опубликована в соавторстве. Соавторы не возражают против использования этих данных в диссертации, что подтверждается отсутствием конфликта интересов в соответствующих публикациях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Выполненная диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 4.2.3. – Инфекционные болезни и иммунология животных. Проведенные исследования представляют важное научное и практическое значение, которое заключается в разработке и совершенствовании комплексных омиксных методик, интегрирующих геномные и протеомные данные, с целью идентификации специфических молекулярных маркеров возбудителей

инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, что является основой для создания высокоэффективных диагностических инструментов.

Автореферат адекватно отражает содержание диссертации.

Вопросы и замечания.

При положительной оценке рассматриваемой диссертации в целом хотелось бы обратить внимание на некоторые недоработки и получить ответы на возникшие вопросы:

1. Каким образом Вы проводили анализ иммуногенных эпитопов у выбранных белков?

2. Какие именно параметрические и непараметрические тесты Вы применяли при статистической обработке данных?

3. Как осуществляли контроль неспецифической гибридизации праймеров при проведении мультиплексной ПЦР и контроль референсных нуклеотидных последовательностей после проведенной разработки тест-систем; по какому принципу производился отбор маркеров для выявления вируса ящура?

4. По какому принципу проводился отбор возбудителей для анализа?

5. Как проводили процедуру кодон-оптимизации, контроль правильности укладки и функциональной активности при препаративной наработке синтетического антигена для индикации иммунного ответа на инфицирование бруцеллами?

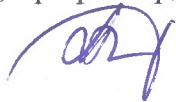
Заключение.

Диссертация Хаммадова Наиль Ильдаровича представляет собой завершенный научно-квалификационный труд, в результате которого решена важная научная проблема. По актуальности выбранной темы, новизне, объему и достоверности полученных данных, степени обоснованности научных положений, сформулированных выводов и рекомендаций рецензируемая диссертационная работа Хаммадова Наиль Ильдаровича на тему «Омиксные исследования при разработке диагностических средств ветеринарного назначения», соответствует критериям ВАК Минобрнауки России п. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 25.01.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук, а ее автор, Хаммадов Наиль Ильдарович, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 4.2.3. - Инфекционные болезни и иммунология животных.

Материалы диссертационной работы рассмотрены на расширенном заседании кафедр иммунологии и биотехнологии, вирусологии и микробиологии имени академика В.Н. Сюрина ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина». Отзыв одобрен единогласно (протокол № 16 от 03.06.2026 г.)

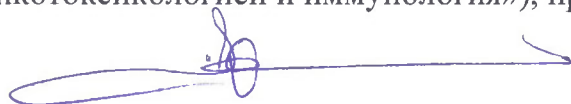
Заведующий кафедрой иммунологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И.

Скрябина»), доктор биологических наук (по специальностям 06.02.02 «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» и 03.01.06 «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»), профессор



Пименов Николай Васильевич

Профессор кафедры иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина», доктор ветеринарных наук (по специальности 16.00.03 «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»), профессор



Литвинов Олег Борисович

Заведующий кафедрой вирусологии и микробиологии имени академика В.Н. Сюрина ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина», кандидат биологических наук (по специальности 16.00.03 «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»), доцент



Денисенко Татьяна Евгеньевна

Подписи профессоров Н.В. Пименова, О.Б. Литвинова, доцента Т.Е. Денисенко заверяю



Учёный секретарь Учёного совета
ФГБОУ ВО «МГАВМиБ –
МВА имени К.И. Скрябина»
Маркин Сергей Сергеевич

08.06.2026 г.

Почтовый адрес: 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23,
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина
Контактный телефон: +7 (495) 377-91-17.
e-mail: rector@mgavm.ru