

**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 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 учёной степени доктора
ветеринарных наук по специальности 4.2.3 Инфекционные болезни и
иммунология животных

Актуальность избранной темы. Инфекционные болезни
сельскохозяйственных животных (бруцеллёз, туберкулез, ящур, грипп птиц,
африканская чума свиней) приводят к значительным потерям в
животноводстве, что зачастую выражается в падеже скота, снижении
продуктивности, затратах на лечение, на карантинные мероприятия и
организацию экспорта животных и продукции. В этом плане ранняя и
достоверная диагностика позволяет минимизировать перечисленные риски.
Необходимо указать, что существующие методы (бактериологический,
серологический и др.) имеют ряд недостатков, в частности: сроки получения
результатов, низкая чувствительность и специфичность. Кроме того,
традиционные рутинные методы не позволяют выявить латентно
протекающие инфекции, а также имеются сложности с идентификацией

новых и мутировавших штаммов патогенов. В настоящее время резко возрастают угрозы новых и возвращения старых инфекций, появление новых штаммов возбудителей, эволюция патогенов и расширение их ареала требуют оперативного внедрения высокоточных диагностических инструментов. Вследствие вышеизложенного, комплексный омиксный подход (геномика, протеомика, транскриптомика, метаболомика) позволяет эффективно выявлять специфические генетические и протеомные маркеры патогенов с высокой точностью и чувствительностью. Кроме того, омиксные методы позволяют дифференцировать близкородственные штаммы и отслеживать их эволюцию, а также обнаруживать возбудителей на ранних стадиях инфекции, в том числе при низкой концентрации патогена, а также анализировать молекулярные механизмы патогенеза и иммунного ответа.

Таким образом, считаю, что разработка и оптимизация комплексных омиксных молекулярно-биологических подходов для выявления генетических и протеомных маркеров возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных является актуальной научной и практической проблемой. Её решение обеспечит создание высокоэффективных средств диагностики, что будет способствовать укреплению ветеринарного благополучия, повышению продуктивности и обеспечению биологической безопасности страны.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций определяется методологической грамотностью постановки и реализации задач работы, использованием соответствующего методического и материально-технического уровня для проведения экспериментов, обоснованным анализом фактического материала. Поставленные цель и задачи исследования соответствуют сформулированной рабочей гипотезе. Выдвинутые автором научные положения, выводы и практические предложения

документированные таблицами, рисунками и схемами, которые носят доказательный характер и подтверждают глубокий анализ материала. Практические рекомендации соответствуют поставленным задачам и полученным результатам исследования, хорошо обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертационного исследования.

Достоверность и новизна исследований, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается комплексом методологических подходов и контрольных процедур. В рамках диссертационного исследования автором получены принципиально новые научные результаты в области молекулярной диагностики ряда инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Так, впервые выявлены и охарактеризованы специфические нуклеотидные последовательности для широкого спектра патогенов. К ним относятся вирусы клещевого энцефалита, ящура, ПГ-3, ВД-БС, ИРТ, а также бактерии родов: *Mycobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Borrelia*. Проанализированы в разрезе нуклеотидной архитектуры цитокины свиней (интерферон-гамма и фактор некроза опухоли). Выявленные последовательности обладали высокой специфичностью и позволяют надёжно дифференцировать искомые организмы от близкородственных видов. Также, соискателем разработан оригинальный подход к дизайну праймеров, основанный на детальном анализе полиморфизма генов. Данный методический подход позволяет для каждого генетического маркера индивидуально оценить различие между искомыми и близкородственными организмами по нуклеотидному составу. Кроме того, соискателем достигнуто минимизирование риска перекрестной реактивности за счет тщательного подбора консервативных (для индикации вида) и переменных (для дифференциации штаммов) локусов генома. Оптимизирована методика получения нативных антигенов из бактерий вида *Mycobacterium bovis* (штамм Bovinus 88), которая позволяет выделять

антигены высокой степени очистки и активности, что обеспечивает надежную индикацию противотуберкулезных антител методом ИФА, а также повышает чувствительность и специфичность серологической диагностики туберкулёза сельскохозяйственных животных. Кроме того, соискателем идентифицированы новые иммунодоминантные антигены и иммуногенные эпитопы для возбудителей бруцеллёза и энцефаломиеелита коз. На основе этих данных получены рекомбинантные и синтетические антигены, которые могут эффективно выявлять специфические антитела в сыворотке крови животных и могут служить основой для создания новых диагностических тест-систем и вакцин.

Соискателем создан и апробирован универсальный алгоритм омиксных исследований для разработки средств диагностики инфекционной патологии сельскохозяйственных животных. По нашему мнению, полученные результаты открывают новые возможности для ранней и точной диагностики инфекционных болезней животных, что имеет важное значение для ветеринарной медицины.

Необходимо отметить, что интеграция омиксных данных осуществлялась посредством биоинформатического анализа с использованием баз данных Gen Bank и специализированного программного обеспечения. На этом этапе выявлялись консервативные участки генов и иммуногенных эпитопов белков. Важным критерием степени достоверности явилось подтверждение теоретических гипотез экспериментальными данными. Кроме того, выбранные генетические маркеры демонстрировали минимальный полиморфизм в широкой панели штаммов и изолятов, что обосновывает их пригодность для специфической индикации. Также протеомный анализ позволил идентифицировать иммунодоминантные антигены и иммуногенные эпитопы (карбиксилтрансфераза, трансгликозилаза и др.), которые затем валидировались на реактивность с сыворотками крови исследованных животных. Необходимо отметить, что

молекулярно-биологические процедуры (выделение нуклеиновых кислот, дизайн праймеров, амплификация, протеомное профилирование) выполнялись с применением стандартизированных протоколов и современного сертифицированного оборудования. Кроме того, для оценки аналитических характеристик разработанных тест-систем определяли их чувствительность и специфичность.

Полученный цифровой материал был обработан с использованием соответствующих биостатистических методов, что позволило соискателю достоверно оценить значимость полученных различий и существенно снизить влияние случайных факторов. Также, в ходе экспериментальных исследований автором активно использовались положительные и отрицательные контроли, что позволило минимизировать риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Полученные данные подтверждены информативными таблицами ($n=38$) и рисунками ($n=91$). Основные положения диссертационного исследования были представлены на обсуждение в профильных различных конференциях Всероссийского и Международного масштаба, где вызвали заинтересованность и получили обратную связь от научной общественности.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Научная значимость рецензируемой диссертации заключается в расширении теоретических знаний в области биоинформационного анализа, молекулярной биологии и серологической диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Разработанные подходы делают предложенные методы более доступными для широкого круга ветеринарных врачей-практиков. Также созданные алгоритмы и методики могут служить основой для дальнейших научных изысканий в области выявления генетических и протеомных маркеров различных патогенов. Полученные данные создают условия для углублённого понимания молекулярных

механизмов взаимодействия патогенов и макроорганизмов, что открывает перспективы для разработки новых средств профилактики и лечения инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Практическая значимость диссертационного исследования подтверждена опубликованными методическими рекомендациями, нормативно-технической документацией, отчётами о научно-исследовательской работе по тематике «Омиксные исследования при разработке диагностических средств ветеринарного назначения», а также рядом патентов РФ. Так, автором предложены методические рекомендации: «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». Из нормативно-технической документации (технические условия) соискателем разработаны ТУ 21.10.60-003- 00492374-2023 «Тест-система «Туберкулёз ИХА» для серологической индикации антител методом иммунохроматографического анализа (ИХА) к возбудителю туберкулёза в сыворотке или плазме крови крупного рогатого скота и ТУ 21.10.60-007- 00492374-2020 «Тест-система «Туберкулёз КРС ИФА» для серологической индикации антител животных против туберкулеза», а так же ТУ 21.10.60-004- 00492374-2025 «Тест-система «КЧС, Ауески ОТ-ПЦР-РВ» для индикации возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески». Следует отметить, что разработанные методики и тест-системы уже внедрены или готовы к внедрению в ветеринарных диагностических лабораториях, научно-исследовательских институтах ветеринарного профиля, а также в системе ветеринарного надзора и контроля для обеспечения биологической безопасности и эпизоотического благополучия животноводческой отрасли.

Оценка содержания, завершенность работы и качество ее содержания. Диссертационная работа Хаммадова Н.И. изложена на 392 страницах компьютерного текста, включает в себя введение, обзор

литературы, основную часть и заключение. Список использованной литературы включает 519 источников, из них 121 на иностранных языках.

Диссертационная работа полностью соответствует заявленной теме «Омиксные исследования при разработке диагностических средств ветеринарного назначения». Автор самостоятельно выполнил весь объем биоинформационных исследований, 19 лабораторных анализов, участвовал в написании научных статей, оформлении патентов, подготовке докладов и выступлениях на конференциях, а также участвовал в проведении лабораторных испытаний и разработке нормативно-технической документации для производства диагностических наборов. Часть исследований проведено и опубликовано в соавторстве. Соавторы не имеют возражений против использования в диссертационной работе совместно полученных данных, что подтверждается соответствующими данными об отсутствии конфликта интересов в научных публикациях.

Поставленная цель и задачи исследования реализованы в полном объёме, в частности, выявлены специфические генетические и протеомные маркеры целого ряда возбудителей, а также разработаны олигонуклеотидные затравки и мультиплексные ПЦР-системы. Кроме того, предложен алгоритм омиксных исследований для разработки диагностических средств.

Тема научного исследования раскрыта всесторонне с учётом как фундаментальных, так и прикладных аспектов. Также работа содержит существенные элементы научной новизны, достоверность и обоснованность результатов, высокую практическую значимость, а также внедрение результатов исследований в практическую ветеринарию. Представленная диссертация имеет чёткую структуру, соответствующую регламентным требованиям.

Так, раздел «Введение» содержит обоснование актуальности, цель, задачи, научную новизну и практическую значимость, методологию и методы

исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов.

В разделе «Обзор литературы» соискателем систематизирован обзор современных научных данных по теме (генетические и протеомные маркеры возбудителей, методы молекулярной диагностики). Проведён критический анализ существующих диагностических подходов, в частности ПЦР, ИФА, ИХА и др. с указанием их преимуществ и ограничений. Соискателем наглядно описаны проблемы и пробелы в существующей практике диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Кроме того, автором дано обоснование выбора направления исследования и необходимости разработки новых методов диагностики. В обзоре дано теоретическое обоснование использования омиксных технологий для решения поставленных задач, а также формирование гипотез исследования на основе анализа литературы.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны объекты исследования, в частности, вирусы клещевого энцефалита, ящура, ПГ-3, ВД-БС, инфекционного ринотрахеита, бактерии рода *Mycobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Borrelia*; цитокины свиней и др.), а также штаммы, изоляты, сыворотки крови, реагенты, оборудование. В данной главе соискатель подробно излагает молекулярно-биологические методы исследования, в том числе выделение нуклеиновых кислот, дизайн праймеров, ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ, мультиплексную амплификацию. Также определённое место в данной главе отведено изложению статистических методов, обработке данных и конкретно - критериям достоверности, оценке чувствительности и специфичности.

Глава «Результаты и обсуждение собственных исследований» структурирована по этапам исследования. Так, вначале излагаются результаты биоинформатического скрининга и экспериментальной проверки консервативных участков генов вируса ящура. Затем автором приводится

дизайн олигонуклеотидных затравок, и, в частности, описаны последовательности праймеров и зондов.

В следующем разделе данной главы соискатель подробно излагает результаты разработки способа мультиплексной индикации нуклеиновых кислот возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески и констатирует, что выявленные генетические маркеры возбудителей ряда инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных с минимальным полиморфизмом были идентичны максимальному количеству штаммов и изолятов клещевого энцефалита, ящура, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, ПГ-3, туберкулёза, бруцеллёза, болезни Ауески, классической чумы свиней и др.

В последующих разделах отражены результаты по разработке способов специфической индикации нуклеиновых кислот особо опасных, социально значимых и трансмиссивных инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Также приведены результаты исследований по определению протеомных маркеров для серологической диагностики возбудителей бруцеллёза, туберкулёза, артерита-энцефалита коз. Подробно излагаются результаты разработки синтетического пептида, для выявления иммунного ответа на присутствие антигенов возбудителей бруцеллёза в сыворотке крови восприимчивых животных.

В конце главы соискатель обобщает проведённые исследования и предлагает для лабораторной практики ветеринарных учреждений алгоритм омиксных тестов для диагностики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, позволяющий наиболее эффективно подобрать порядок действий и выбрать ресурсы для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

В главе «Заключение» соискатель проводит логичное и последовательное обобщение основных результатов исследования, а также подтверждение достижения цели и выполнение запланированных задач,

направленных на разработку комплексных омиксных подходов для диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

В завершающей части диссертационной работы соискатель приходит к 8 логичным выводам, подкреплённым фактическими данными, полученными в ходе комплексного научно-исследовательского подхода.

Подтверждение опубликования основных результатов в научной печати. Материалы диссертационного исследования стали основой для написания 39 научных работ, 13 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России в перечне российских рецензируемых научных журналов, 9 статей в журналах из Международной базы научных цитирований в Web of Science core Collection и (или) Scopus, а также получено 3 патента.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Автореферат соответствует содержанию диссертации и раскрывает её научные положения. Выводы, практические предложения в автореферате и диссертации идентичны. Диссертация и автореферат соответствуют требованиям Положения о присуждении учёных степеней, утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

В целом, оценивая диссертационную работу Хаммадова Наиля Ильдаровича положительно, хотелось бы получить ответы на ряд вопросов:

1. Были ли обнаружены штаммы микроорганизмов, не детектируемые разработанными тест-системами? Если да, то какая причина?
2. Учитывал ли автор регионы распространения патогенов при выборе маркеров?
3. Как решалась проблема амплификации близкородственных видов, например не туберкулёзных микобактерий при диагностике туберкулёза?

4. По данным Россельхознадзора, в стране почти не встречается туберкулёз крупного рогатого скота, почему вы уделили такое пристальное внимание серологической диагностике этой болезни?
5. При создании рекомбинантных антигенов вы выделяете одним из важнейших компонентов анализа поиск иммуногенных эпитопов, для серологической диагностики важны В-клеточные эпитопы, а какие иммуногенные эпитопы важны для разработки рекомбинантных вакцин?
6. При анализе наличия иммуногенных эпитопов вы описываете не только В-клеточные иммуногенные эпитопы. Имеют ли диагностическое значение другие иммуногенные эпитопы? И если имеют, как их можно было бы применить?

Заключение. Диссертационная работа 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 учёной степени доктора ветеринарных наук, является завершённой, выполненной на достаточно высоком методическом уровне, научно-квалификационной работой, имеющей важное теоретическое и практическое значение для ветеринарной науки и практики. В ней представлено решение проблемы, имеющей существенное значение в области современной, высокотехнологической диагностики возбудителей инфекций сельскохозяйственных животных, представляющих ветеринарную, экономическую и социальную угрозу народному хозяйству РФ. Основные положения и выводы логичны и аргументированы.

По актуальности темы, новизне, теоретической и практической значимости, объёму выполненных исследований диссертационная работа Хаммадова Наиля Ильдаровича в полной мере

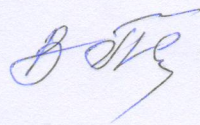
соответствует требованиям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор заслуживает присуждения учёной степени доктора ветеринарных наук по специальности

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных.

Зинков.2026 г.

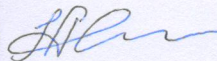
Официальный оппонент:

Доктор ветеринарных наук, профессор, профессор
кафедры ветеринарной микробиологии,
инфекционных и инвазионных болезней
ФГБОУ ВО Омский ГАУ



Плешакова Валентина Ивановна

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



Дмитриева Нелли Алексеевна

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