



РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ (ФГБУ «ВГНКИ»)

123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5
тел.: (495) 982-50-84, факс (499) 253-14-91
ИНН 7703056867, КПП 770301001
E.mail: vgnki@fsvps.gov.ru
<http://vgnki.ru>

О Т З Ы В

официального оппонента о диссертационной работе **Камалиевой Юлии Ринатовны «Молекулярно-генетический анализ микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и объектов внешней среды в Республике Татарстан»**, представленной на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология в диссертационный совет Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Актуальность темы диссертационного исследования

Туберкулез крупного рогатого скота (далее – КРС) наносит значительный экономический ущерб животноводству и представляет реальную опасность заражения людей, поэтому актуальными остаются организация и проведение обязательных противотуберкулезных мероприятий.

Резервуар инфекции так разнообразен и обширен, что мероприятия по борьбе с туберкулезом КРС не могут ограничиться только этим видом животных, а должны охватывать всех домашних и диких животных, а также объекты окружающей среды.

До настоящего времени не разработаны высокоэффективные средства иммунной защиты и лечения, поэтому основой профилактических и оздоровительных мероприятий при туберкулезе животных является диагностика

болезни. Прижизненная диагностика туберкулеза у КРС проводится аллергическим методом с использованием туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих. В качестве дополнительных методов исследования применяют офтальмопробу, пальпебральное введение туберкулина, симультанную пробу с туберкулином очищенным (ППД) для млекопитающих и аллергеном очищенным комплексным из атипичных микобактерий (КАМ) или с туберкулином очищенным (ППД) для птиц.

Следует отметить, что в настоящее время при диагностике туберкулеза КРС возрастает актуальность проблемы неспецифических реакций на туберкулин, так как в благополучных по этой болезни хозяйствах Российской Федерации выявляется до 90% реагирующих животных. В стране складывается ситуация, когда количество реагирующих животных в благополучных хозяйствах в несколько раз превышает количество таковых в неблагополучных хозяйствах. Опасаясь пропустить туберкулез, в некоторых хозяйствах, не проводя дополнительных исследований, всех реагирующих животных сдают на убой, что приводит к значительному экономическому ущербу.

Поэтому исследования, предпринятые автором диссертации для установления причин проявления неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих, – проведение молекулярно-генетического анализа нетуберкулезных микобактерий, выделенных из патологического материала КРС и объектов внешней среды в Республике Татарстан, являются актуальными.

В частности, большое значение в этом аспекте имеет также выполненный автором ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по туберкулезу КРС в Республике Татарстан с 2010 по 2020 гг., представляющий собой одну из поставленных задач.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Диссертационная работа выполнена в 2018-2021 гг. на кафедре эпизоотологии и паразитологии, в межкафедральной лаборатории иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и 28 животноводческих хозяйствах различных форм собственности Республики Татарстан.

В диссертации представлены результаты эпизоотологических, аллергических, и молекулярно-генетических исследований с применением материалов и методов, соответствующих современному уровню развития науки. Для выполнения поставленных задач диссертантом изучена ветеринарная отчетность ГУВ Кабинета Министров Республики Татарстан, а также использованы соответствующие методические указания, учебные пособия,

инструкции и программное обеспечение Vector NTI 9.1 (Thermo Fisher Scientific, США).

Список литературы включает 232 источника (с 1952 по 2020 гг.), из которых 75 - зарубежных авторов. За XX век представлено 46 % ссылок, за XXI век – 54 %, что подтверждает изучение автором современного состояния рассматриваемой темы диссертации.

Диссертационная работа, изложенная на 148 страницах (в том числе 14 страниц приложений), содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, основное содержание работы, включающее материалы и методы исследований и результаты собственных исследований, заключение, предложения производству, список иллюстративного материала, список условных обозначений, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 14 рисунками.

В Приложениях представлены:

- Решение РОСПАТЕНТА от 21.12.2021 о выдаче патента на изобретение «Набор высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для детекции и дифференциации нетуберкулезных микобактерий» с заключением по результатам экспертизы;

- Временные ветеринарные правила по применению набора высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР-РВ с целью дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота в ветеринарии (в порядке апробации), утвержденные начальником ГУВ Кабинета Министров Республики Татарстан 12.03.2021;

- Акты о проведении оценки специфичности и чувствительности набора олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР в режиме реального времени:

 - от 22.04.2021, утвержденный ГБУ «Республиканская ветеринарная лаборатория» Республики Татарстан;

 - от 02.08.2021, утвержденный ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория»;

- Акты внедрения результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технических работ в высших учебных заведениях:

 - от 30.03.2021, утвержденный ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ;

 - от 22.11.2021, утвержденный ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА;

- Карты обратной связи о принятии материалов диссертации к использованию в учебном процессе и НИР, а также при чтении лекций по переподготовке и повышению квалификации работников сельского хозяйства:

 - от 17.11.2021, утвержденная ФГБОУ ВО «Башкирский ГАУ»;

от 2021, утвержденная ФГБОУ ДПО «Татарский институт переподготовки кадров агробизнеса»;

- Диплом XXIII Всероссийской агропромышленной выставки «Золотая осень 2021» о награждении ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ бронзовой медалью «За разработку высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для дифференциации неспецифических аллергических реакций на туберкулин у КРС методом полимеразной цепной реакции».

Во введении к диссертации обоснована актуальность темы, показана степень ее разработанности, сформулированы цель работы и задачи для ее выполнения, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы диссертационного исследования, основные положения, выносимые на защиту. Представлены степень достоверности, сведения об апробации работы и публикациях автора, а также объеме и структуре диссертации.

Обзор литературы (23 стр.) состоит из четырех разделов, представляющих собой:

- описание нетуберкулезных микобактерий, их классификации и распространения во внешней среде;

- информацию о неспецифических реакциях на туберкулин для млекопитающих у КРС и причинах их проявления;

- описание методов дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у КРС;

- информацию об экономическом ущербе, причиняемом микобактериозами.

В «Основном содержании работы», разделе «Материалы и методы исследований» приведена информация о месте и времени выполнения диссертационной работы, объекте исследования и предмете научного анализа.

Для проведения научных экспериментов было использовано: КРС из различных сельскохозяйственных предприятий, благополучных по туберкулезу (100 голов), от которого было отобрано 100 проб патологического материала (лимфатические узлы); 119 смывов с объектов внешней среды; референтные штаммы 7 видов нетуберкулезных микобактерий, являющихся представителями всех четырех групп по классификации Раньона:

- 1 группа – *M. kansasii* (шт. ВИЭВ);

- 2 группа – *M. scrofulaceum* (шт. 526);

- 3 группа – *M. avium* (шт. Vet. 1387), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (шт. Центрально-Любинский), *M. intracellulare* (шт. ТМС 1473);

- 4 группа – *M. smegmatis* (шт. 9-77), *M. fortuitum* (шт. 409).

Далее представлены разделы по результатам исследований автора с их обсуждением, содержащие:

- анализ эпизоотической ситуации по туберкулезу КРС в Республике Татарстан за более чем десятилетний период с составлением картограммы частоты проявления неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих у КРС по районам республики;

- разработку высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий;

- оценку специфичности олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов;

- оценку порога обнаружения ДНК с помощью олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий;

- идентификацию микобактерий 6 видов, выделенных из патологического материала, полученного от реагирующего на туберкулин для млекопитающих КРС;

- идентификацию микобактерий 5 видов, выделенных из смывов с объектов внешней среды животноводческих хозяйств.

Следует отметить, что в конце каждого раздела автором представлен обобщающий вывод, который способствует лучшему пониманию материала.

Экспериментальные данные подвергались статистической обработке с применением программы Microsoft Excel по показателям средних значений полученных данных с установлением достоверности по методу Стьюдента-Фишера. Результаты исследований достоверны.

Материалы диссертации отражены в 6 научных работах автора, из которых 3 опубликованы в изданиях, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ («Аграрная наука» и «Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана»), две статьи опубликованы в изданиях, входящих в базу данных Web of Science, 1 работа – в Сборнике трудов научной конференции. Кроме того, автором получено решение о выдаче патента РФ и ГУВ Кабинета Министров Республики Татарстан утверждены Временные ветеринарные правила, куда вошли результаты диссертационной работы.

Материалы диссертации доложены и обсуждены в 2019-2021 гг. на четырех Международных научно-практических конференциях, проходивших в Казани и Самаре, а также на XXIII Всероссийской агропромышленной выставке «Золотая осень 2021» в Москве.

Анализ результатов, представленных автором диссертации, позволяет сделать вывод, что они содержат *научную новизну*. В результате ретроспективного анализа эпизоотической ситуации по туберкулезу КРС с 2010 по 2020 гг. впервые составлена картограмма частоты проявления

неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих у КРС в сельскохозяйственных предприятиях Республики Татарстан.

Разработаны олигонуклеотидные праймеры и зонды для идентификации нетуберкулезных микобактерий 7 видов методом ПЦР в режиме реального времени и с электрофоретической детекцией. Проведена индикация и идентификация нетуберкулезных микобактерий, выделенных из патологического материала КРС, реагирующих на туберкулин для млекопитающих, и из смывов с объектов внешней среды (помет синантропных птиц, почва, навозные желоба, подстилка, кормушки, полы и проходы) благополучных по туберкулезу сельскохозяйственных предприятий Республики Татарстан.

Приоритет и научная новизна исследований подтверждены решением Роспатента от 27.04.2021 о выдаче патента РФ на изобретение.

Значимость для науки и производства полученных автором результатов

Выполненные исследования имеют теоретическое и практическое значение для ветеринарии. Автором диссертации за последние 11 лет определены эпизоотическая ситуация по туберкулезу КРС и нозоареал болезни, установлена частота проявления неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих в Республике Татарстан. Определен видовой состав некоторых нетуберкулезных микобактерий, персистирующих в организме КРС и объектах внешней среды животноводческих комплексов.

Разработан набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий с целью дифференциации неспецифических аллергических реакций на туберкулин для млекопитающих методом ПЦР, обладающий высокой специфичностью и чувствительностью, что подтверждено 2 актами производственных испытаний.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Автором разработаны Временные ветеринарные правила по применению набора высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР-РВ с целью дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота в ветеринарии (в порядке апробации), утвержденные ГУВ Кабинета Министров Республики Татарстан 18.03.2021.

Результаты исследований автора используются в учебном процессе соответствующих кафедр четырех профильных ВУЗов страны: «Казанская ГАВМ имени Н.Э. Баумана», Ижевская ГСХА, Башкирский ГАУ, а также «Татарский институт переподготовки кадров агробизнеса».

Степень завершенности диссертационной работы и качество ее оформления

Диссертационная работа Камалиевой Юлии Ринатовны является актуальной завершённой научно-квалификационной работой, посвящённой ретроспективному анализу эпизоотической ситуации по туберкулезу КРС в Республике Татарстан за более чем десятилетний период и разработке набора высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР-РВ с целью дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у КРС.

Работа выполнена на достаточно высоком методическом уровне, обладает научной новизной, теоретической и практической значимостью, написана профессиональным языком, оформлена грамотно в соответствии с необходимыми требованиями.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат соответствует основным положениям диссертационной работы. Представленные выводы и практические предложения являются логичным завершением проведенных исследований, соответствуют поставленным задачам и являются доказательством достижения поставленной цели.

Заключение о соответствии диссертации критериям Положения о присуждении ученых степеней

В связи с возникшими вопросами, считаю необходимым сделать следующие замечания и пожелания:

1. Почему для исследований были выбраны именно эти семь видов нетуберкулезных микобактерий? Будут ли продолжены аналогичные исследования с другими видами нетуберкулезных микобактерий для пополнения набора?

В связи с этим вывод 4 следовало бы дополнить: «В организме КРС, реагирующего на ППД-туберкулин для млекопитающих *из 7 изученных* персистируют 6 видов атипичных микобактерий...»

2. Желательно было бы указать, из какой коллекции получены референтные штаммы нетуберкулезных микобактерий.

3. Была ли проведена для 100 голов КРС, реагирующих на туберкулин для млекопитающих, симультанная проба с КАМ или с туберкулином для птиц, как предписано соответствующими документами, в том числе и рекомендациями МЭБ? Было бы интересным сравнить данные симультанной пробы с данными диссертационных исследований по ПЦР с использованием разработанных праймеров и зондов.

4. Последние «Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены

карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулеза», утвержденные приказом Минсельхоза России от 08.09.2020 № 534 также предписывают, что убой животных в благополучных хозяйствах должен проводиться только после проведения дифференцирующих реакций.

В связи с этим, существуют ли какие-либо преимущества применения метода ПЦР по сравнению с проведением симультанной пробы для дифференциации неспецифических реакций?

5. В диссертации и автореферате в небольшом количестве имеются неточности, опечатки и неудачные выражения. Например, в Оглавлении отсутствует раздел «Предложения производству», в «Объеме и структуре диссертации» (стр. 10) пропущены «Предложения производству», «Список иллюстративного материала» и «Список условных обозначений».

Высказанные замечания и пожелания носят рекомендательный характер и не отражаются на общей положительной оценке работы, поэтому рассмотрение диссертации «Молекулярно-генетический анализ микобактерий, изолированных от крупного рогатого скота и объектов внешней среды в Республике Татарстан» дает основание считать ее соответствующей требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Камалиева Юлия Ринатовна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

Ученый секретарь ФГБУ «Всероссийский
государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов»
(ФГБУ «ВГНКИ»), доктор биологических наук,
профессор



Букова Наталия Константиновна

14.02.2020

123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5

+7 (495) 982-50-84; vgnki@fsvps.gov.ru; bukova@vgnki.ru