

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Эльбядовой Евдокии Игнатьевны на тему: «Выделение и идентификация штаммов мытного стрептококка для разработки вакцины против мыта лошадей», представленную в диссертационный совет Д 999.215.02, созданного на базе ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Актуальность темы диссертационной работы.

Мыт - острая инфекционная болезнь лошадей, преимущественно жеребят, характеризующаяся в типичных случаях лихорадкой, гнойным воспалением слизистых оболочек носовой полости и глотки с последующим нагноением и абсцедированием подчелюстных лимфатических узлов. Болезнь высоко контагиозная, в течение нескольких суток может заразиться до 50-70% стада. Заболевание вызывает *Streptococcus equi* (*Str. equi*). Экономический ущерб, наносимый мытом, значителен, связан с временным нарушением развития жеребят, потерей работоспособности взрослыми лошадьми, затратами на проведение лечебно-профилактических мероприятий.

Лошади, переболевшие мытом, приобретают стойкий иммунитет, который обычно продолжается всю жизнь. Впрочем, и не болевшие лошади после пяти лет становятся слабо восприимчивы к мыту, что можно объяснить наличием среди поголовья лошадей иммунизирующей субинфекции.

Вопрос о формах постановки и выполнения задачи ликвидации мыта лошадей в настоящее время не получил исчерпывающего разрешения. Это обусловлено главным образом тем, что еще не выяснены многие принципиальные вопросы иммунологии и специфической профилактики данной болезни. В свете вышеизложенного, диссертационная работа Эльбядовой Е.И., посвященная изучению эпизоотической ситуации по мыту лошадей в Республике Саха (Якутия) и разработке вакцины для его специфической профилактики, является актуальной для ветеринарной науки и практики. Для достижения поставленной цели диссертантом были поставлены и решены соответствующие задачи:

- изучить эпизоотическую ситуацию по мыту лошадей в Республике Саха (Якутия);
- выделить и изучить культурально-морфологические, биохимические, молекулярно-генетические свойства изолятов мытного стрептококка;
- депонировать новый штамм *Str. equi*;
- изготовить инактивированную вакцину против мыта лошадей из депонированного штамма *Str. equi* с иммуномодулятором;
- провести доклинические и клинические испытания вакцины против мыта.

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

Степень обоснованности диссертационных исследований следует из результатов анализа литературных и экспериментальных данных, полученных в ходе исследований. Автором изучены и критически проанализированы публикации и теоретические положения отечественных и иностранных исследователей, касающиеся вопросов этиологии, патогенеза, диагностики, лечения и специфической профилактики мыта лошадей. Основные научные положения, выводы и рекомендации по использованию научных выводов сформулированы исходя из результатов эпизоотологического мониторинга по мыту лошадей в Республике Саха (Якутия), исследований патологического материала от больных и павших животных, выделения и изучения иммунобиологических свойств возбудителя болезни, а также экспериментальных данных по разработке вакцины против мыта лошадей.

Евдокия Игнатьевна Эльбядова провела большую, многоплановую и последовательную работу для достижения поставленных целей. Объем материалов и методов исследований достаточно для получения объективных и обоснованных результатов. Экспериментальный материал подвергнут статистической обработке.

Результаты исследований не вызывают сомнений как по достоверности полученных данных, так и по выводам, сделанных на их основе. Представленные в работе научные положения обоснованы и подтверждены результатами лабораторных исследований патологического материала, выделением и изучением возбудителя болезни, а также доклиническими и клиническими испытаниями вакцины на целевых животных.

Таким образом, анализ полученных результатов позволил автору высказать ряд положений, которые четко обоснованы и подтверждены данными собственных исследований, а сформулированные на их основе выводы полностью соответствуют представленным материалам.

Достоверность результатов и новизна исследований и полученных результатов.

Достоверность диссертационного исследования Эльбядовой Е.И. гарантирована достаточностью материала, в том числе экспериментального, его адекватностью поставленным задачам. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом, что позволяет считать полученные результаты достоверными, сделанные выводы обоснованными и вытекающими из результатов проведенных исследований.

Автором впервые в России выделен, идентифицирован и депонирован во Всероссийской государственной коллекции микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, штамм бактерий *Str. equi* «Н-5/1», нуклеотидная последовательность ампликонов которого депонирована в международной базе данных NCBI GenBank. На штамм получен патент РФ, он признан производственным при изготовлении вакцин.

Разработана и внедрена в ветеринарную практику инактивированная вакцина против мыта лошадей. Автором изучены основные характеристики вакцины: безвредность, пирогенность, иммуногенная активность и ее эффективность в условиях хозяйств, неблагополучных по мыту лошадей.

Новизна исследований, представленных в диссертационной работе Эльбядовой Е.И., очевидна, она подтверждена патентом РФ на вакцину и свидетельством на базу данных «Мыт лошадей».

Значимость для науки и практики полученных соискателем результатов.

Проведенная Эльбядовой Е.И. работа – серьезный труд, обогащающий знания о мыте лошадей. Результаты диссертационной работы имеют существенное значение для науки и практики, поскольку они не только расширяют представление о роли возбудителя болезни, но и позволяют решить специфическую профилактику мыта лошадей.

Практическая ценность работы состоит в том, что автором разработана и внедрена в производство инактивированная вакцина против мыта лошадей с иммуномодулятором. Разработана и утверждена Россельхознадзором научно-техническая документация (досье) на вакцину. Вакцина зарегистрирована в реестре лекарственных средств.

Широкое внедрение вакцины в ветеринарную практику РФ безусловно будет способствовать повышению эффективности проводимых лечебно-профилактических мероприятий при мыте лошадей.

Материалы, представленные в диссертационной работы, вошли в 2 методические пособия. Они также могут быть использованы в научно-исследовательской и практической работе ветеринарных специалистов, при написании монографий, справочных пособий, в учебном процессе.

Соответствие диссертации, автореферата и публикаций критериям «Положения о присуждения ученых степеней».

Автореферат оформлен методически верно, содержит основные разделы диссертации и раскрывает ее научные положения. Заключение и выводы в автореферате и диссертации идентичны. Диссертация и автореферат соответствует критериям «Положения о присуждения ученых степеней».

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы. Научное исследование выполнено соискателем ученой степени самостоятельно, в ходе которого проведен анализ научной литературы по теме диссертации, поставлена цель и определены задачи, освоены современные и классические методики исследований. Соискатель лично проводил молекулярно-генетические исследования по идентификации изолятов мытного стрептококка методом ПЦР, доклинические и клинические испытания вакцины против мыта лошадей. Совместно с другим сотрудниками лабораторий ветеринарной биотехнологии и разработки микробных препаратов принимала активное участие в депонировании производственного штамма *Str. equi* «Н-5/1» во ВГНКИ, в получении патента на него и свидетельства о регистрации базы данных «Мыт лошадей».

Принимала также активное участие в разработке технологии изготовления вакцины и научно-технической документации (досье) на нее.

Опубликованные результаты исследований подтверждают значительный вклад диссертанта в решение поставленных задач.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность и замечания по оформлению.

Диссертационная работа Эльбядовой Е.И. построена по традиционному плану и состоит из разделов: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практическое использование результатов исследований, список использованной литературы, приложения.

Диссертация изложена на 173 страницах компьютерного текста, содержание иллюстрировано 17 таблицами и 9 рисунками. Список литературы включает 208 источников, в том числе 76 иностранных авторов.

Во введении автором лаконично изложен методологический аппарат диссертационного исследования с обоснованием выбора темы и краткой информацией о её современном состоянии. На основе сформулированной проблемы отражены цель и задачи исследований; научная новизна; теоретическая и практическая значимость работы; методология и методы исследований; основные положения, выносимые на защиту; личный вклад автора в проведенные исследования; степень достоверности и апробация результатов работы; публикации; объем и структура диссертации; благодарности.

В обзоре литературы, состоящем из 7 разделов, автором анализируются наиболее значимые, современные отечественные и зарубежные литературные источники, приводится краткая историческая справка по мыту лошадей и особенности ведения коневодства и природно-климатические условия в Якутии. Подробно дана характеристика возбудителя мыта лошадей, его культурально-морфологические и биологические свойства; течение, клинические признаки и патогенез болезни; эпизоотология и особенности распространения мыта лошадей, а также методы диагностики и лечения болезни. Отдельно рассмотрены вопросы иммунитета и специфической профилактики мыта лошадей. Четко обозначены нерешенные проблемы, которым посвящено диссертационное исследование. Все упомянутые в тексте работы присутствуют в библиографическом списке.

Собственные исследования описаны во второй главе, которая состоит из 10 разделов. В первом разделе «Материалы и методы исследования» автор приводит объем и схему комплексных поэтапных исследований. Работа проведена на базе лаборатории ветеринарной биотехнологии Якутского НИИ сельского хозяйства, ООО НПЦ «Хоту – Бакт» совместно с ВГНКИ (г. Москва) и лабораторией биотехнологии ГАУ Технопарк Якутии. Биологические пробы взяты из различных уласов Республики Саха (Якутия), а также Республики Казахстан.

Методы и методология исследований адекватны поставленным целям и задачам, они соответствуют современному уровню. В работе применялись

клинико-эпизоотологические, бактериологические, иммунобиологические, генетические методы исследований. Молекулярно-генетический анализ выделенных культур проведен в лаборатории биотехнологии «Технопарк Якутия» методом полимеразной цепной реакции, чувствительность и достоверность которой для идентификации мытного стрептококка подтверждены исследованиями в отделе качества и стандартизации пробиотических препаратов ВГНКИ. Нуклеотидная последовательность ампликонов исследована в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН и депонирована в международной базе данных NCBI. Доклинические и клинические испытания вакцины проведены в коневодческих хозяйствах Республики Саха (Якутия) согласно приказу МСХ РФ №101 от 6 марта 2018 г. Приводится описание основных методических приемов, использованных автором в ходе выполнения работы, которые обеспечили получение научно-обоснованных и достоверных данных по изучаемым вопросам. Глава написана подробно и не вызывает возражений.

Во втором разделе приведены результаты анализа эпизоотической обстановки в Республике Саха (Якутия) по мыту лошадей. Установлено, что заболеваемость лошадей в стационарно-неблагополучных пунктах остается высокой – до 65%.

В третьем разделе обобщены результаты лабораторных исследований по выделению и идентификацию возбудителя мыта лошадей. Исследованы 63 пробы биологического материала от здоровых, клинически больных и павших жеребят. Выделены 40 изолятов бактерий кокковидной формы. Проведена дифференциация их с использованием специальных питательных сред и различных биологических тестов. При этом 6 изолятов отнесены к *Str. equi*, 3 изолята отнесены к роду *Staphylococcus* и 4 изолята – к роду *Enterococcus*.

В четвертом разделе приведены результаты молекулярно-генетической идентификации выделенных культур мытного стрептококка методом ПЦР. Нуклеотидная последовательность гена 16S рПНК *Str. equi* была обнаружена у 6 изолятов, выделенных от клинически больных мытом жеребят. Далее 3 штамма *Str. equi* из 6 («Н-1 каз», «Н-5/1», «Н-12-3»), после молекулярно-генетического анализа в ВГНКИ, отобраны в качестве производственных при разработке иммунобиологических препаратов.

В разделах 5 и 6 обобщены результаты изучения культурально-морфологических, биологических свойств штамма *Str. equi* «Н-5/1», используемого для создания вакцины против мыта лошадей, которые позволили депонировать данный штамм в коллекции микроорганизмов в ФГБУ «ВГНКИ» (рег. номер ВКШМ-Б141П от 22.05.2018 г.) и получить на него патент РФ на изобретение № 2703485 от 17.10.2019 г.

Огромный научно-практический интерес представляют результаты исследований Эльбядовой Е.И. по разработке технологии изготовления инактивированной вакцины против мыта лошадей, которые описаны в разделах с 7 по 10. При выполнении этой задачи на первом этапе подобран штамм *Str. equi* «Н-5/1», обладающий наиболее характерными видовыми

характеристиками и ростовыми свойствами, и иммуномодулятор – культуральная жидкость штамма бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3. Разработана технологическая схема производства вакцины. Доклинические испытания вакцины показали, что она стерильна, стабильна, безвредна, апиrogenна, обладает высокой иммуногенной активностью. Обеспечивает выживаемость не менее 90 % вакцинированных белых мышей после контрольного заражения. При клиническом испытании вакцины в 7 стационарно неблагополучных коневодческих хозяйствах Республики Саха (Якутия) установлено формирование напряженного иммунитета у 97,6% иммунизированного молодняка лошадей. При этом экономический эффект на 1 рубль затрат составил 6,65 рублей.

Результаты исследований позволили авторам разработать и внедрить в ветеринарную практику РФ отечественную вакцину против мыта лошадей. Препарат зарегистрирован Россельхознадзором для широкого применения в ветеринарной практике РФ.

Заключение представляет анализ полученных данных в сопоставлении с материалами, имеющимися в литературе, а также включает в себя 8 выводов, которые резюмируют выполненную Эльбядовой Е.И. работу и вытекают из результатов собственных исследований.

Работа хорошо апробирована. Ее результаты были представлены на 10 научно-практических конференциях различного уровня, опубликованы в 18 научных работах, из них 2 в рецензируемых журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus, 2 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрической базе данных Russian Science Citation Index, 2 методических пособиях, 1 патенте РФ на изобретение и 1 базе данных.

В целом работа представляет законченный, хорошо оформленный и убедительно иллюстрированный научный труд.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Отмечая в целом актуальность, новизну и научно-практическую значимость проведенных исследований, оценивая положительно диссертационную работу Эльбядовой Е.И. хотелось бы получить разъяснения на ряд вопросов, возникших при ознакомлении с работой:

1. Есть ли принципиальные различия в схемах производства разработанной Вами вакцины и других аналогичных вакцин, выпускаемых за рубежом?

2. За счет чего культуральная жидкость бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 повышает иммуногенность вакцины?

3. На основании результатов каких исследований Вы рекомендуете использовать штамм *Str. equi* «Н-1каз» для разработки вакцины против мыта лошадей для табунного коневодства Республики Казахстан (стр. 118)?

4. В списке использованной литературы много старых отечественных литературных источников. чем можно это объяснить?

Вышеуказанные вопросы не снижают положительной оценки оппонируемой диссертационной работы, поскольку они отчасти носят дискуссионный характер и вызваны интересом к этой работе.

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

Диссертационная работа Эльбядовой Евдокии Игнатьевны на тему: «Выделение и идентификация штаммов мытного стрептококка для разработки вакцины против мыта лошадей», представленная в диссертационный совет Д 999.215.02, созданного на базе ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важных теоретических и прикладных задач, связанных с изучением этиологии и разработкой средств специфической профилактики мыта лошадей, имеющих существенное значение для ветеринарной науки и практики. Актуальность темы, новизна, научно-практическая значимость результатов, научных положений и практических предложений позволяют констатировать, что диссертация Эльбядовой Е.И. соответствует критериям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

Спиридонов Геннадий Николаевич

доктор биологических наук по специальности 06.02.02 - Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, заведующий лабораторией бактериальных патологий животных ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

Почтовый адрес организации с индексом: 420075, г. Казань, Научный городок-2;

Контактный телефон: (843) 239-53-37;

e-mail: spiridonovkzn57@gmail.com

