

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора ветеринарных наук Оробец В.А. на диссертационную работу Макавчик Светланы Анатольевны на тему: «Бактериальные болезни крупного рогатого скота, вызванные полирезистентными микроорганизмами (диагностика, лечение и профилактика)», представленную в диссертационный совет Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальностям 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология и 06.02.03 – ветеринарная фармакология с токсикологией

1. Актуальность темы диссертации. Распространение антимикробной резистентности является одной из самых острых проблем современности, несущей биологические и экономические угрозы для всех стран. Антимикробная резистентность снижает эффективность мероприятий по профилактике и лечению инфекционных и паразитарных болезней человека и животных.

Антибиотики широко используются в животноводстве для профилактики заболеваний и для стимулирования роста, что предполагает массовое одновременное применение препаратов у большого количества животных. Иногда одни и те же антибиотики или классы антибиотиков применяются и в животноводстве, и в медицине, что создает риск появления и распространения резистентных бактерий, в том числе таких, которые могут быть возбудителями инфекции и у животных, и у людей. Важность сельскохозяйственных животных как резервуаров резистентных патогенов человека документально подтверждена. Опасность представляет также распространение генов резистентности от бактерий животных к бактериям человека.

Устойчивость к антибиотикам формирует проблему для проведения эффективного лечения постоянно увеличивающегося числа инфекций. Все более необходимым становится рациональное использование существующих антимикробных препаратов с учетом спектра их активности и профиля антибиотикорезистентности основных возбудителей. В связи с этим чрезвычайно актуально проведение научных исследований, направленных на совершенствование микробиологической диагностики, лечения и профилактики бактериальных инфекций животных, вызванных полирезистентными микроорганизмами.

Задачи, поставленные автором на разрешение полностью соответствуют «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» (Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р) в части совершенствования

мер по предупреждению и ограничению распространения и циркуляции возбудителей с антимикробной резистентностью; разработке противомикробных препаратов, технологий и средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений.

Исходя из вышеизложенного, разработка алгоритма микробиологической диагностики, лечения и профилактики бактериальных инфекций крупного рогатого скота, вызванных полирезистентными микроорганизмами, чему и посвящена рецензируемая диссертационная работа, является актуальной задачей ветеринарной науки и практики.

2. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертации. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений определяется правильностью постановки и решения задач по выполнению работы, использованием соответствующего методического уровня и оборудования для проведения экспериментов, анализом фактического экспериментального и теоретического материала.

Высказанные автором научные и практические суждения по решению рассматриваемых вопросов аргументированы и вытекают из объема фактического, экспериментального и клинического материала, полученного с использованием современных методов исследований, адекватных целям и задачам работы. При выполнении работы автором использовались общепринятые методы научного познания: взаимосвязь и взаимообусловленность; синтез и анализ; обобщение и сравнение; наблюдение, измерение и интерпретация; специальные методы: эпизоотологический, микробиологические, биологические – изучение патогенных и вирулентных свойств, протеомные, молекулярно-генетические, фармако-токсикологические и клинические методы на современных приборах и оборудовании.

Для анализа результатов исследований применялись статистические и математические методы, позволяющие обеспечить достоверность и объективность полученных данных.

Научные положения, выводы и практические рекомендации теоретически и экспериментально обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

3. Достоверность и новизна исследований научных положений, выводов и рекомендаций. Достоверность результатов диссертационной работы основана на достаточном количестве проведенных опытно-экспериментальных исследований, экспериментов и наблюдений, реализованных в соответствии поставленными целью и задачами, с использованием современных методов и методик.

Значительный перечень задач, поставленных соискателем на разрешение позволил с использованием современных методов исследования уточнить известные и получить новые данные о распространении возбудителей с атипичными биологическими свойствами и с множественной лекарственной резистентностью. Впервые на региональном уровне выделен патогенный и полирезистентный эмерджентный микроорганизм *Stenotrophomonas maltophilia*. Установлен феномен появления свойств полирезистентности к антибактериальным препаратам, гипермукоидности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae*.

Новизна работы подтверждена разработанными и запатентованными способами инактивации возбудителя кампилобактериоза крупного рогатого скота (№ 2642249) и получения гидроокись алюминиевой масляной теовакцины против кампилобактериоза (№ 2644654), получен патент на штамм *Klebsiella pneumoniae subsp.pneumoniae*, обладающий способностью к биопленкообразованию (№ 2733144).

Результаты исследований автора по доклинической и клинической оценке Азициклина, определению его эффективности, используют в ООО НВЦ «Агроветзащита» для разработки нормативно-технической документации.

4. Практическая значимость и внедрение. Практическая значимость работы Макавчик С.А. заключается в том, что полученные результаты исследований по мониторингу эпизоотической ситуации бактериальных инфекций крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ являются основой для коррекции мероприятий по профилактике инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами. Результаты исследований автора используются ГК «Люмэкс» в работе по усовершенствованию преаналитического и аналитического этапа определения спектра выделяемой микрофлоры. Практическая значимость подтверждается, в том числе, использованием результатов доклинических и клинических исследований препарата для ветеринарного применения «Азициклин» при разработке инструкции по его применению ООО НВЦ «Агроветзащита»:

По результатам выполненных исследований автором подготовлены «Методические рекомендации по профилактике и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц» (одобрены и рекомендованы к изданию научно-техническом Советом при Комитете по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области, протокол № 2 от 10.02.2017 г).

- «Методические рекомендации по диагностике и профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота» (одобрены ученым советом

ФГБОУ ВО СПбГАВМ и утверждены Заместителем Председателя Правительства, председателем комитета по агропромышленному и рыбохозяйственному комплексу Ленинградской области 30.05.2017 г).

- «Лабораторные методы диагностики инфекций, вызываемых *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*» (методические рекомендации одобрены и рекомендованы к изданию Комитетом по ветеринарии Псковской области, от 30.04.2020 г).

Теоретические и практические разработки диссертационной работы используются в учебном процессе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»; ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого»; ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья»; ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина; ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э Баумана».

5. Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней». Диссертация и автореферат написаны в соответствии с требованиями ВАК при Минобрнауки России, изложены хорошим и доступным языком, хорошо иллюстрированы таблицами и рисунками. Содержание и выводы автореферата соответствуют материалам диссертации.

Автореферат, изложенный на 39 страницах, содержит основные разделы диссертации и раскрывает ее научные положения.

Выводы и практические предложения в автореферате и диссертации идентичны. Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

6. Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, презентативность эмпирического материала. Диссертационная работа является результатом исследований автора с 2010 по 2020 гг. на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Работа выполнена в соответствии с тематическим планом-заданием на выполнение научно-исследовательских работ по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за счет средств федерального бюджета по теме: в 2016 году «Разработка методических рекомендаций по профилактике и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц»; в 2017 году «Разработка системы мероприятий по профилактике кампилобактериоза крупного рогатого скота с использованием усовершенство-

ванной вакцины»; в 2020 году «Изучение биологических свойств возбудителей инфекционных болезней животных, выделяемых на территории Российской Федерации, и сравнение их с находящимися в коллекциях возбудителей болезней, в том числе, общих для человека и животных с целью оценки изменчивости их культуральных и морфологических свойств, патогенности, а также изучения их устойчивости к факторам внешней среды и дезинфекционным средствам. Изыскание новых эффективных средств и методов дезинфекции».

В работах, опубликованных по теме диссертации, выполненных лично и в соавторстве, весомая часть исследовательской деятельности принадлежит Макавчик Светлане Анатольевне. Проведение исследований, изложение и практическая реализация результатов осуществлены при личном участии соискателя.

Диссертационная работа выполнена под консультационным сопровождением доктора биологических наук, профессора Сухинина А.А. и доктора ветеринарных наук, профессора, академика РАН Енгашева С.В.

7. Содержание диссертации, ее завершенность, публикации автора. Диссертация изложена на 370 страницах компьютерного текста. Состоит из введения (с. 7-20), обзора литературы (с. 20-72), собственных исследований, включающих материалы и методы исследования (с. 73-95) и результаты исследований и их анализ (с. 96-376), обсуждения полученных результатов (с. 377-393), заключения (с. 394-399), рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы (400), предложений для практики (с. 401-402), перечня условных обозначений (с. 403-404), списка литературы (с. 405-448) и приложения.

Работа иллюстрирована 44 таблицами и 63 рисунками. Список литературы включает 396 источников, в том числе 191 иностранных авторов.

Во «Введении» диссертантом рассматриваются актуальность и целесообразность изучаемого вопроса, приводятся поставленные на разрешение цель и задачи исследований, показана научная новизна, теоретическая и практическая ценность работы, методология и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, публикации по результатам исследований.

Глава «Обзор литературы» содержит 8 подразделов, в которых приводятся сведения, содержащиеся в научной литературе о бактериальных болезнях, ассоциированных с антибиотикорезистентными возбудителями и их значении в современной структуре инфекционной патологии животных. Описаны факторы, влияющие на активизацию условно-патогенной микрофлоры и рост числа полирезистентных инфекций у животных. Изложены известные

критерии этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов и современные методы их идентификации. Особое внимание автор уделяет ретроспективному обзору антибиотикорезистентности микроорганизмов как основе выбора рационального антимикробного лечения, борьбе с лекарственно устойчивыми бактериями в ветеринарной практике и профилактике их распространения

Обзор литературы завершён заключением, обосновывающими актуальность и перспективность исследований автора.

Глава «Собственные исследования» состоит из двух разделов: «Материалы и методы исследования», «Результаты исследований и их анализ».

В разделе «Материалы и методы исследований» (п. 2.1.2.) изложены методы бактериологических исследований, в том числе метод культивирования микроорганизмов, идентификации микроорганизмов с учетом биохимических свойств, определения гипермукоидного фенотипа у микроорганизмов, определения вирулентных свойств культур микроорганизмов для лабораторных животных, видовой идентификации микроорганизмов методом MALDI-TOF-MS анализа выделенных чистых культур микроорганизмов, молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики, определения и анализа результатов чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, фармако-токсикологические методы изучения антимикробных препаратов, методы определения терапевтической эффективности изучаемого препарата на продуктивных животных, методы статистической обработки цифровых показателей.

Раздел «Результаты исследований» (п. 2.2) включает 8 подразделов, в которых автор раскрывает данные исследований в соответствии с поставленными целью и задачами.

В подразделе 2.2.1 диссертационной работы изложены результаты выявления и идентификации бактериологическим методом условно-патогенных микроорганизмов с атипичными свойствами, изолированных от крупного рогатого скота, приведена фенотипическая характеристика выделенных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, результаты выявления и идентификации бактериологическим методом изолятов кампилобактерий и микоплазм. Автором установлено, что одновременное применение бактериологических методов с использованием MALDI-TOF-MS позволяет существенно повысить достоверность видовой идентификации, обоснованность и быстроту принятия клинических решений (п. 2.2.2).

В ходе выполнения работы соискателем проведена апробация микрочиповой системы для обнаружения нуклеиновых кислот с лиофилизированными реактивами для молекулярно-генетических исследований в производ-

ственных условиях, дана оценка диагностических возможностей и апробация в лабораторных условиях ПЦР в режиме реального времени в формате микрочипов с лиофилизированными реактивами, установлены методологические подходы к созданию диагностических панелей молекулярно-генетического выявления условно-патогенных микроорганизмов, изолированных от животных, подтверждена ценность метода секвенирования при видовой идентификации этой группы микроорганизмов (п. 2.2.2).

Результаты мониторинга возбудителей бактериальных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах Северо-Западного ФО РФ изложены в п. 2.2.4. По результатам молекулярно-генетических и бактериологических исследований определен спектр микроорганизмов органов репродукции крупного рогатого скота, установлены особенности микробной этиологии инфекционных воспалительных болезней у телят и спектр микроорганизмов при инфекционных маститах коров

По результатам определения антибиотикорезистентности условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов, установлено, что большинство изолятов культур *E.coli* наиболее чувствительны к неомицину ($S=100,0\%$), ципрофлоксацину ($S=93,0\%$), но резистентны к остальным исследуемым антибиотикам: гентамицину ($R=14,0\%$). Изоляты культур *E.coli* были резистентны к ампициллину ($R=76,0\%$) и результат резистентности распространяется на аминопенициллины (ампициллин, амоксицилин), цефалоспорины I поколения (цефалексин) (п.2.2.5 Микробиологические основы рациональной фармакотерапии животных). При определении чувствительности к АМП микроорганизмов, изолированных от крупного рогатого скота установлено, что 73,0% исследованных микроорганизмов устойчивы к 2 – 6 фармакологическим группам АМП, из них к двум группам АМП устойчиво 5,0% изолятов, а остальные 68,0% были полирезистентными. Из 68,0% полирезистентных изолятов 31,0% автором классифицированы как экстремально резистентные.

Фармако-токсикологическими исследованиями установлено, что изучаемый препарат «Азициклин» по степени воздействия на организм относится к 4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76. Определены параметры острой и подострой токсичности, раздражающего, аллергического действия препарата «Азициклин» на лабораторных животных (п. 2.2.6). Азициклин по данным клинических исследований показал высокую терапевтическую эффективность при остром бронхите и бронхопневмонии телят при 3-кратном введении в дозе 0,25 г на 10 кг массы животного с интервалом 24 ч, а при хроническом бронхите и гнойно-катаральной пневмонии при 5-кратном введении с интервалом 24 ч (п. 2.2.7). Экономический эффект примененных автором

схем лечения крупного рогатого скота при ассоциативных микоплазменных инфекциях в хозяйстве составил 49,6 руб. на один рубль затрат.

В главе «Обсуждение полученных результатов» диссертант аргументированно интерпретирует результаты собственных исследований, опираясь на литературные источники, что показывает компетентность автора и позволяет представить диссертационную работу, как квалифицированный труд подтверждающий решение поставленных целей и задач.

В заключении 11 выводов отражают исследования диссертанта, сформулированы на основании полученных результатов, достаточно аргументированы и объективны.

Рассматриваемая работа представляет собой систематическое изложение, анализ и обобщение объективно достоверных экспериментальных результатов и сведений. Для описания изучаемых процессов, автором обоснованно предложена адекватная терминология. Термины определены четко и однозначно, а их совокупность представляет собой взаимосвязанную систему.

По материалам диссертационной работы опубликованы 35 научных работ, в том числе 24 в изданиях, включенных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ в перечень российских рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации, 1 статьи в журналах из международных баз данных Web of Science и Scopus, получено 3 патента РФ.

Результаты исследования и основные положения диссертации представлены и обсуждены на научно-практических мероприятиях различного уровня.

8. Вопросы, возникшие при рассмотрении диссертации.

При рассмотрении диссертации возникли вопросы, на которые автору при защите необходимо дать ответы и пояснения:

1. Как Вы можете охарактеризовать, с учетом полученных результатов собственных исследований, принципиальную схему профилактики антибиотикорезистентности возбудителей бактериальных болезней в отдельном хозяйстве или регионе и перспективы ее практического использования?

2. Может ли, на Ваш взгляд, явиться определенной альтернативой антибиотикам использование при ряде рассматриваемых бактериальных болезней вакцин, в том числе аутогенных?

3. В таблице 2.2.6.3.2 (стр. 258) приведены результаты определения динамики прироста массы тела у крыс при введении Азициклина в трех дозах в течение 21 сут в сравнении с контролем. Поясните, какие отмеченные данные контроля и опытных групп имеют достоверные отличия?

4. В п.2.1.2.5.4 «Исследование терапевтической эффективности препарата Азициклина при лечении телят с болезнями органов дыхания» указано, что «установлена целесообразность применения комплексного препарата Азициклина для антибактериальной терапии телят», в том числе за счет его иммуномодулирующего эффекта. Уточните, какими результатами подтверждается иммуномодулирующий эффект Азициклина?

5. При определении терапевтической эффективности применения препарата Азициклина при хронической бронхопневмонии и серозно-катаральной пневмонии телят (п. 2.2.7.1) указано, что «применение препарата Азициклина оказалось более эффективным, чем лечение по схеме, применяемой в хозяйстве» и «Азициклин не уступал по терапевтической эффективности схемы, применяемой в хозяйстве, а учитывая сроки выздоровления и кратность обработок – даже превосходил». Уточните, что включала базовая схема лечения в хозяйстве при данных заболеваниях, каковы сроки выздоровления и кратность обработок в сравниваемых группах?

6. При определении влияния антибактериального препарата Азициклина на клинические и биохимические показатели крови здоровых и больных телят с респираторной патологией Вы справедливо указываете, что «со временем чувствительность патогенов может снизиться (с повышением МИК), тем самым уменьшая вероятность клинического успеха при рекомендуемых режимах дозирования», а в случае тяжелого течения инфекции «доза препарата может быть другой». В этом случае для сохранения антимикробной активности необходимо увеличение локальных концентраций антибиотика в отношении патогенов-мишеней или коррекция схемы терапии?

Вопросы не снижают общей положительной оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа Макавчик Светлана Анатольевна на тему: «Бактериальные болезни крупного рогатого скота, вызванные полирезистентными микроорганизмами (диагностика, лечение и профилактика)» выполнена на достаточном экспериментальном и производственном материале. Исполнителем проведены и обобщены значительные по объему и новизне исследования, полученные результаты имеют научное и прикладное значение. Диссертация соответствует паспортам специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксинологией и иммунология и 06.02.03 – ветеринарная фармакология с токсикологией.

Диссертация является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится комплексное решение научной проблемы по усовершенствованию диагностики и терапии при бактериальных болезнях круп-

ного рогатого скота, вызванных полирезистентными микроорганизмами, имеющей значение для развития знаний в области ветеринарных наук, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Макавчик Светлана Анатольевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора ветеринарных наук по специальностям 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология и 06.02.03 – ветеринарная фармакология с токсикологией.

Официальный оппонент:


доктор ветеринарных наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»,
заведующий кафедрой терапии и фармакологии.

355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

Тел.: +7 (928)-327-60-16


E.mail: orobets@yandex.ru

1 сентября 2021 года

 Оробец Владимир Александрович

Подпись доктора ветеринарных наук, профессора заверяю:

Проректор по научной и инновационной работе ФГБОУ ВО Ставропольский государственный аграрный университет, профессор

 Бобрышев Алексей Николаевич

