

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук Ярыгиной Елены Игоревны на диссертационную работу Капустиной Ольги Владимировны на тему **«Разработка и совершенствование средств и методов контроля особо опасных инфекций, вызванных вирусами порядка Mononegavirales»**, представленную на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальностям 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, микология с микотоксикологией и иммунология

Актуальность темы диссертационной работы

Пристальное внимание ветеринарной службы и здравоохранения приковано к особо опасным, в том числе зооантропонозным болезням, так как усилившиеся миграционные потоки из стран Африки и Азии могут привести к завозу на территорию Российской Федерации лихорадку долины Рифт (ЛДР), высокопатогенный грипп птиц (ГП) или болезнь Ньюкасла (БН), которые входят в список трансграничных особо опасных болезней.

Угроза тяжелых последствий появления и распространения трансграничных болезней особо остро стоит ввиду отсутствия эффективных лицензированных средств их оперативной диагностики, специфической профилактики и лечения. Следовательно, существует необходимость проведения опережающих исследований по разработке средств и методов противодействия опасности появления и распространения трансграничных болезней животных, обеспечивающих своевременную индикацию и идентификацию возбудителя, формирование раннего стойкого протективного иммунитета.

Изучению структуры отдельных компонентов вириона с целью понимания патогенеза болезни способствует применение моноклональных антител (МКА) узкой направленности, способных выявлять даже незначительные изменения в антигенных эпитопах вируса.

В настоящее время рекомбинантные технологии являются ведущими при разработке диагностических тест-систем и средств профилактики инфекционных болезней, так как позволяют создавать уникальные препараты стандартизированных МКА и рекомбинантных аналогов вирусных белков, которые, в свою очередь, обеспечивают высокую чувствительность, эффективность и безопасность методов диагностики и средств профилактики.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности проведения научно-исследовательской работы по созданию и совершенствованию средств и методов ранней диагностики, мониторинга и специфической профилактики указанных инфекционных болезней на основе достижений современной биотехнологии, молекулярной биологии, иммунологии.

Основной целью исследований Капустиной О.В. являлась разработка средств и методов ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла, а также стратегий специфической профилактики особо опасных инфекций (на примере ЛДР и гриппа птиц H5) на основе достижений молекулярной биологии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить реактивность рекомбинантных белков и плазмид, кодирующих гены иммунодоминантных белков вирусов ЛДР и гриппа А;

- усовершенствовать на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных аналогов структурных белков вирусов способ получения моноклональных антител заданной узкой специфичности и изучить их иммунохимические свойства;

- разработать и усовершенствовать методы ранней диагностики и серологического мониторинга лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла;

- определить кандидатный штамм вируса ЛДР для разработки, в перспективе, инактивированной вакцины против ЛДР;

- отработать лабораторные методы и подобрать лабораторную модель для контроля качества вирусного сырья; безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт;

- отработать методы повышения антигенной и иммуногенной активности инактивированного антигена вируса ЛДР и ДНК-конструкций;

- разработать оптимальные стратегии индукции раннего иммунитета против гриппа птиц подтипа H5 и лихорадки долины Рифт;

- разработать (на примере ЛДР) схему системных подходов обеспечения готовности противодействия, в случае угрозы возникновения, особо опасных инфекций.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые в РФ разработан способ получения МКА направленной специфичности с использованием рекомбинантной плазмиды, несущей вставку гена гликопротеина Gn вируса ЛДР и соответствующего рекомбинантного аналога, позволяющий получать в короткие сроки высокий процент (75-80%) положительных клонов гибридом, продуцирующих МКА, в большинстве своем (58%) специфичные к конформационным эпитопам вирусного антигена.

Показана способность МКА, полученных к рекомбинантному белку Gn, синтезируемому *in vivo* и *in vitro*, выявлять в различных серологических реакциях, в том числе иммуноцитохимическим методом, антигенные детерминанты гликопротеина Gn вируса ЛДР.

Использование рекомбинантного аналога NP вируса ЛДР позволяет дифференцировать в угрожаемой по ЛДР зоне инфицированных животных и привитых инактивированной или ДНК Gn/Gc вакцинами.

Дано научно-практическое обоснование использования аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» вируса ЛДР в перспективе разработки инактивированной вакцины, молекулярно-биологические свойства которого обеспечивают экологическую безопасность и эффективность вакцины для применения в угрожаемой зоне.

Также научно обоснована разработанная на примере ЛДР схема среднесрочного (5-6 мес.) прогнозирования, комплексный подход по обеспечению готовности противодействия в случае угрозы возникновения особо опасных и экзотических инфекций.

Новизна полученных результатов подтверждена патентами на изобретение № 2409384, 20.01.2011 г.; № 2457255 от 27.07.2012 г.; № 2534343 от 27.11.2014 г.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что экспериментально подтверждены теоретические основы получения высокоактивных специфичных к конформационным эпитопам Gn/Gc вируса ЛДР МКА с использованием генно-инженерных конструкций и рекомбинантных белков, что позволяет значительно сократить сроки получения специфических моновалентных и моноклональных антител.

Разработаны различные форматы полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) для

ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла, позволяющие выявлять геном и антигены вирусов на ранних стадиях их репродукции, дифференцировать штаммы по вирулентности, а также от других вирусов, представителей соответствующих семейств.

Разработаны «Набор препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла», Инструкция по применению и СТО ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии № 00495549-00112006, утвержденные заместителем руководителя Россельхознадзора 31.10.2006 г. регистрационный номер ПВР-1-3.6/01714. «Набор препаратов...» внедрен в ветеринарную практику и использовался во время эпизоотий гриппа птиц в РФ в 2006 году.

Разработаны критерии и лабораторные методы оценки качества вирусодержащего материала и инактивированного антигена вируса ЛДР, его антигенности и иммуногенности с использованием лабораторной модели (аутбредные белые мыши).

Экспериментально подтверждена концепция активации системы врожденного и стимуляции развития адаптивного иммунитета в результате ДНК-иммунизации, которая приводит к праймированию иммунной системы, индукции раннего клеточного и специфического гуморального иммунитета у привитых животных.

Предложенная стратегия гетерогенной прайм-бустерной иммунизации позволяет получать моноспецифические и моноклональные антитела к отдельным белкам или их фрагментам, а также дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных (DIVA) с применением ТФ ИФА на основе для рекомбинантного нуклеопротеина и соответствующих МКА.

Предложена схема системных технологических решений, использование которых позволяет в короткие сроки получать биологически активные препараты на основе рекомбинантных плазмид и белков и обеспечить производство средств ранней диагностики и профилактики ЛДР в случае угрозы возникновения болезни.

Научно-практическое значение работы подтверждается разработкой методических указаний (положений) по выявлению и идентификации возбудителей гриппа птиц подтипов H5, H7 и N1; ЛДР, утвержденных в установленном порядке в 2006-2013 гг.

Оценка содержания диссертации и достоверности результатов исследований

Достоверность полученных результатов подтверждена актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке. Научные положения, выводы, практические предложения диссертационной работы отражают ее содержание.

Основные положения диссертационной работы и методическая основа ее выполнения доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии; на секции Инфекционная патология Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (2009-2013 гг.); представлены на международных и региональных научно-практических конференциях (Москва, 2007 г.; Ставрополь, 2012 г.; Улан-Уде, 2013 г.; Санкт-Петербург, 2013 г. Практические аспекты применения научных разработок были представлены за период 2002-2014 гг. соискателем при проведении семинаров в «Учебном центре по подготовке, переподготовке и повышению квалификации специалистов ветеринарных лабораторий субъектов Российской Федерации» ФБГУ ЦНМВЛ (г. Москва).

В рамках выполнения диссертационной работы опубликовано 35 печатных работ, из них 10 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций. Приоритетность результатов исследований по теме диссертации подтверждена 2 патентами РФ на изобретение.

Во введении автор обосновывает выбор темы диссертационной работы и ее актуальность, информирует о степени разработанности проблемы, формулирует цель и задачи исследований, научную новизну, теоретическую и практическую значимость результатов исследования, указывает на степень их достоверности, заявляет основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту, информирует о личном вкладе соискателя, а также об объеме и структуре диссертации.

В обзоре литературы диссертант осветила вопросы, связанные с эпизоотической обстановкой по особо опасным зооантропонозным инфекциям, таким как блютанг, лихорадка Западного Нила, африканской чумы свиней (п. 2.1).

В п. 2.2 автор дает характеристику вирусов - отдельных представителей семейств *Ortomixoviridae*, *Paramixoviridae* и *Bunyaviridae* порядка *Mononegavirales*.

Учитывая тот факт, что только представители семейства *Paramixoviridae* относятся к порядку *Mononegavirales*, считаю такое название пункта 2.2, а, следовательно, и всей работы, как минимум, некорректным.

П. 2.3 посвящен диагностике особо опасных инфекций (грипп птиц, болезнь Ньюкасла, лихорадка долины Рифт).

В п. 2.4 автор обосновывает преимущества использования рекомбинантных белков в качестве специфических антигенов перед антигенами, полученными традиционными способами.

Достаточно много внимания диссертант уделила гибридным технологиям для получения моноклональных антител (п. 2.5), а также противовирусному и поствакцинальному иммунитету (п. 2.6) и методам повышения иммуногенности вакцинных препаратов (п. 2.7).

Затем в п. 2.8 автор раскрывает историю создания средств специфической профилактики лихорадки долины Рифт.

Завершается обзор литературы п. 2.9, содержание которого посвящено стратегии контроля гриппа птиц, болезни Ньюкасла и лихорадки долины Рифт.

В «Заключении» по обзору литературы автор подтверждает и обосновывает необходимость проведения настоящей работы.

В собственных исследованиях перечислены материалы и методы, которые диссертант использовала для проведения научно-исследовательской работы по теме диссертации.

В результатах собственных исследований диссертант подробно расписывает ход экспериментов, положенных в основу данной работы.

В п. 4.1 «Совершенствование технологии получения антител заданной узкой направленности на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных белков» автор сначала для предварительной оценки функциональной активности полученных рекомбинантных белков определяла в ИФА их антигенную и иммуногенную активность на примере модельных систем, включающих конструкции:

1) pCI-neo/Gc3/3, pCI-neo/Gn/2/2 и pETN32b, несущие вставку генов, кодирующих гликопротеины и нуклеопротеин вируса ЛДР;

2) pInfNP, pInfHA5, кодирующих полноразмерный ген нуклеопротеина вируса гриппа А и консервативный участок гемагглютинаина вируса гриппа птиц подтипа H5;

3) pTT9/ASFVp30, кодирующую конформационный эпитоп фосфопротеина Vp30 вируса АЧС.

Представленные в таблице 1 данные позволили диссертанту сделать вывод, что исследованные рекомбинантные белки обладали выраженной антигенной активностью.

Затем автор приступила к получению моноспецифических сывороток на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных белков (4.1.2). Диссертант утверждает, что рекомбинантные конструкции индуцируют дозозависимый антительный ответ белых мышей на введение изучаемых конструкций. Доза плазмиды 20 мкг и рекомбинантных белков 100 мкг и выше обеспечивает синтез антител в пределах, достаточных для получения впоследствии моноклональных антител.

П. 4.1.3 посвящён совершенствованию технологии получения панели МКА к гликопротеину Gp вируса ЛДР с использованием рекомбинантных конструкций. Автор справилась с поставленной задачей.

П. 4.2 содержит результаты разработки методов ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла.

В этой части диссертации автор сначала в п. 4.2.1. «Методы молекулярной диагностики лихорадки долины Рифт и гриппа птиц H5N1» предлагает к применению различные варианты диагностикумов, в частности ОТ ПЦР для генотипирования вирусов гриппа птиц, тест-систему для выявления геномов вирусов болезни Найроби и лихорадки долины Рифт методом мультиплексной ОТ ПЦР в режиме реального времени.

Рассуждая на тему возможности использования моноклональных антител и рекомбинантных белков для индикации и идентификации антигенов вирусов лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла, диссертант делает заключение, что если у вирусов гриппа А и ЛДР сегментированный геном представлен одноцепочечной минус нитью РНК, а вирус ЛДР представляет высокую опасность для исследователя, то возможно использовать вирусы гриппа А и болезни Ньюкасла в качестве модели при разработке средств ранней диагностики данных болезней.

В п. 4.2.2.1 приводятся результаты разработки метода иммуноцитохимического анализа для обнаружения и дифференциации возбудителей лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла на перевиваемых культурах клеток CV-1, ПСГК, ПС, чувствительных к изучаемым вирусам, и МКА к нуклеопротеину вирусов гриппа А, болезни Ньюкасла, ЛДР, а также к гликопротеину G_n вируса ЛДР. Результаты специфического взаимодействия антител и антигенов вирусов гриппа птиц, болезни Ньюкасла и ЛДР автор представляет на рисунке 14, затем подтверждает их результатами электронной микроскопии клеток линии ВНК-13/21 инфицированной вирусом ЛДР, представленными на рисунке 15.

В 2002 году успешно проведены межведомственные комиссионные испытания опытно-промышленных серий «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла «сэндвич»-вариантом ТФ ИФА», разработанного коллективом авторов, на соответствие требованиям ТЗ и ТУ-10-09110-90 (п. 4.2.2.2), однако широкие научно-производственные испытания «Набора препаратов...» в ветеринарных диагностических лабораториях РФ в 2002-2005 гг. выявили недостатки, связанные с нестабильностью нативных компонентов «Набора препаратов...»; слабой чувствительностью и необходимостью проведения пассажа на КЭ при выявлении антигенов вируса болезни Ньюкасла. Поэтому на следующем этапе работы автором проведены исследования, направленные на улучшение качества и повышение чувствительности данного «Набора препаратов...».

В итоге был разработан вариант двухсайтового твердофазного ИФА на основе моноклональных антител для идентификации вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла. Результаты исследований легли в основу Стандарта организации - СТО (ТУ) 00495549-0011-2006 по изготовлению и контролю «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла» и Инструкции по его применению, утвержденных 31.10.2006 г. заместителем руководителя Росветнадзора РФ. В 2006 г. «Набор препаратов...» был внедрен в ветеринарную практику РФ.

Также автором проведено сравнительное изучение чувствительности и специфичности ИФА с хемилюминисцентной (ИХА) и фотометрической (ТФ ИФА) детекцией результатов реакции для выявления антигенов вирусов и антител к ним. Для отработки оптимальных параметров проведения анализа в качестве

модельной тест-системы взят ДАС ТФ ИФА на основе МКА к нуклеопротеинам вирусов гриппа птиц, болезни Ньюкасла. Автор делает заключение, что метод ИХА может быть рекомендован для диагностики инфекционных болезней. Его отличает высокая чувствительность – белки определяются в пикограммовых количествах, экономия антител – требуется минимальное количество моноклональных антител, низкий уровень фоновой реакции с неспецифическим антигеном при детектируемом уровне реакции со специфическим антигеном.

Диссертант показала (п. 4.2.3), что прямой конкурентный ТФ ИФА на основе рекомбинантного NP является простым, быстрым и удобным, более экономичным методом, который не уступает нТФ ИФА по чувствительности и специфичности. Использование в качестве специфического антигена полноразмерного рекNP вируса гриппа А и конъюгата соответствующих МКА позволяет выявлять специфические антитела в сыворотках крови всех видов животных, а также сывороток, имеющих низкую активность.

Целью исследований следующего раздела (п. 4.2.3.3) являлось изучение возможности применения рекомбинантных аналогов структурных белков NS, Gn/Gc вируса ЛДР, полученных в прокариотической системе экспрессии при разработке тест-систем иммуноанализа для выявления специфических антител к вирусу ЛДР. Автор утверждает, что использование рекомбинантных белков в качестве специфических диагностических реагентов гарантирует безопасность, стандартность, высокую специфичность и низкий фоновый уровень разрабатываемых тест-систем иммуноанализа, которые могут быть использованы для диагностики ЛДР.

Большое внимание диссертант уделила (п. 4.3) современным подходам создания эффективных безопасных вакцин и стратегии вакцинации против особо опасных инфекций (на примере лихорадки долины Рифт и гриппа птиц подтипа H5).

На обосновании результатов изучения иммунобиологических (4.3.1.1) и культуральных (4.3.1.2) свойств, молекулярно-генетических характеристик (4.3.1.2), а также устойчивости штаммов вирусов лихорадки долины Рифт «RVF/2002/09/ПС», «RVF(s)113», «1974-ВНИИВВиМ» и «Энтеббе» к действию инактивантов в качестве претендента на вакцинный был выбран штамм «1974-ВНИИВВиМ», позволяющий получать инактивированное вирусное сырье с максимальным сохранением антигенной и иммуногенной активности.

Определившись со штаммом, автор логично перешла в п. 4.3.1.5 к разработке лабораторных методов контроля вирусного сырья и инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт. Сначала был проведён подбор лабораторной модели для контроля безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт.

Проведенные ранее автором исследования показали, что наиболее чувствительными к вирусу ЛДР являются мыши 1-3 дневного возраста и культуры клеток ВНК-21/13, ПС, что позволило использовать их в качестве модели для определения полноты инактивации вируса. Диссертант отмечает, что использование в процессе инактивации осветленной вирусосодержащей суспензии с концентрацией белка не выше $0,5 \text{ мг/см}^3$, контроля полноты инактивации в течение трех последовательных пассажей на мышах 1-3 дневного возраста и в гомологичной культуре клеток гарантировало высокую степень безопасности изготавливаемого инактивированного антигена вируса ЛДР.

Для оценки иммуногенности инактивированного препарата автор рекомендует использовать в качестве лабораторной модели аутбредных белых мышей массой 18-25 г, так как препараты, обеспечивающие 80-90% защиту иммунизированных мышей с уровнем вируснейтрализующих антител 1:16-1:32, антиагглютинирующих – 1:64-1:128, формировали напряженный протективный иммунитет у 100% привитых овец, начиная с 21-28 суток.

В п. 4.3.1.5.2 автор представляет результаты разработки тест-систем для контроля накопления протективных антигенов вируса лихорадки долины Рифт. Для этого диссертант сначала сконструировала эритроцитарный диагностикум на основе моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину и гликопротеину G_n вируса ЛДР, а затем сравнила эффективность выявления антигенов вируса ЛДР в РНГА и ДАС-ИФА. Сделано заключение, что разработанные РНГА (на основе МКА к гликопротеину) и ДАС-ИФА (на основе МКА к нуклеопротеину вируса ЛДР) могут быть использованы для технологического контроля процесса накопления антигенов структурных иммунодоминантных белков вируса при наработке вирусного сырья для изготовления вакцин против ЛДР.

Диссертант в своей работе также показала, что минимальная иммунизирующая доза инактивированного препарата вируса ЛДР, обеспечивающая 50% защиту от заражения вирулентным вирусом, должна содержать 64 ГАЕ/см^3 .

Автор изучила влияние гидроокиси алюминия (дисперсность 2-10 мкр - 80%), масляного адьюванта, состоящего из 75% вакцинного масла ТУ 38101-307-72, 25% ланолина Р 64.228.131 и полного адьюванта Фрейнда на антигенность и иммуногенность инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт. Для дальнейших исследований предпочтение отдано ГОА, так как при его применении в данном случае происходит также одновременное концентрирование антигена.

Разработку оптимальных стратегий вакцинации против гриппа птиц пятого подтипа и лихорадки долины Рифт (п. 4.3.2) автор начала с изучения эффективности различных вариантов прайм-бустерной иммунизации на основе инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт.

Установлено, что двукратное введение препарата ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР индуцировало у привитых белых мышей синтез защитного уровня вируснейтрализующих антител, в пределах 1:32-1:64. Привитые животные были устойчивы против контрольного заражения вирулентным вирусом штамм «Энтеббе» (1000 ЛД).

Далее автор делает заключение о том, что на 7 сутки после введения рекомбинантных плазмид рInflNP и рInflNA5 в сыворотке крови привитых цыплят выявляли специфические антитела, титр которых превышал фоновое значение нормальной сыворотки в 2 и более раз. Повторное через 14 суток введение рекДНК **не привело** к значительному увеличению уровня специфических антител.

Автор также утверждает, что двукратная внутримышечная гомологичная прайм-бустерная ДНК-иммунизация инкапсулированной рекомбинантной плазмидой рInflNA5 отдельно или в совокупности с рInflNP индуцировала развитие раннего иммунного ответа обоих звеньев, начиная с 7 суток (срок наблюдения) после контрольного заражения. Однако не указано, какой вирулентный штамм был применен для контрольного заражения, и не представлены данные гибели цыплят после контрольного заражения.

В результате изучения эффективности гомологичной прайм-бустерной ДНК-иммунизации против лихорадки долины Рифт автором установлено, что гомологичная прайм-бустерная иммунизация вызывала значительное нарастание титра сывороточных антител только после двух бустер-доз ДНК-конструкций рСI neo/Gc3/3 и рСI-neo/Gn/2/2. Трехкратная гомологичная ДНК прайм-бустерная иммунизация стимулирует усиление аффинности и авидности синтезируемых антител.

В п. 4.3.2.4 представлены результаты воздействия различных систем доставки иммуногена на развитие иммунного ответа против вируса лихорадки долины Рифт на аутбредных мышах. В итоге автор заявляет, что «...стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации [рекДНКGn/Gc→ГОА-сорбированный инактивированный вирусный антиген] оптимально комбинирует с эффектом синергизма способность ДНК-иммунизации индуцировать ранний клеточный иммунитет и способность инактивированной вакцины вызывать развитие гуморального иммунного ответа, а также обеспечивать безопасность производства и применения».

Завершается практическая часть диссертационной работы «Схемой обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) особо опасных инфекций (на примере ЛДР)». Автор заверяет, что результаты лабораторных исследований могут быть использованы в случае непредвиденных обстоятельств для дальнейшей оптимизации в короткие сроки технологических процессов и организации экстренного развертывания промышленного производства необходимых количеств диагностических и вакцинных препаратов.

В главе «Обсуждение результатов» диссертант сравнивает собственные результаты с результатами других исследователей, опубликованными в научных источниках.

Завершается диссертация десятью выводами, которые основаны на результатах выполненной работы.

В автореферате и опубликованных статьях отражено основное содержание работы.

Практические предложения

Предложен способ получения МКА к отдельным иммунодоминантным вирусным белкам (или их фрагментам). Применение «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла» позволяет идентифицировать в пробах инфицированного материала антигены вируса и одновременно дифференцировать грипп птиц и б. Ньюкасла независимо от принадлежности к определенному подтипу, пато- и генотипу соответствующего вируса.

Предложенная двухраундовая ОТ ПЦР с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов позволит при производстве вакцин против ЛДР

проводить контроль генетической стабильности вакцинного штамма, а также в случае возникновения ЛДР дифференцировать вакцинные и эпизоотические штаммы.

ГОО-сорбированный инактивированный антиген вируса ЛДР из аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» и стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации рекДНК G_n/G_c →ГОО-сорбированный инактивированный антиген вируса могут быть использованы для профилактики заражения и распространения ЛДР в угрожаемых зонах и осуществления DIVA концепции.

Предложенная схема (на примере ЛДР) сочетания данных прогнозирования, вспышек ЛДР, библиотеки генов иммунодоминантных белков вируса позволит в кратчайшие сроки развернуть производство средств ранней диагностики, профилактики на основе применения ДНК-конструкций, рекомбинантных белков и инактивированного антигена вируса. Мероприятия, реализуемые в соответствии с предлагаемой схемой, призваны обеспечить эпизоотическую и, в конечном счете, биологическую безопасность РФ.

Вопросы и замечания.

1. Название работы подразумевает, что объектом изучения будет вирус, принадлежащий к порядку **Mononegavirales**, но, среди всех вирусов, взятых в данную работу, только вирус болезни Ньюкасла относится к этому порядку.

2. В «Обзоре литературы» п. 2.1 носит название «**Эпизоотическая обстановка по особо опасным зооантропонозным инфекциям, вызываемым представителями Mononegavirales**», однако в тексте нет даже упоминания о вирусах этого порядка (см. стр. 19-20).

3. В «Обзоре литературы» п. 2.2 носит название «**Характеристика вирусов - отдельных представителей семейств Ortomixoviridae, Paramixoviridae и Bunyaviridae порядка Mononegavirales**», но только представители семейства **Paramixoviridae** относятся к указанному порядку. Кроме того, на стр. 20 название порядка дважды написано с ошибками. Там же указано (цитата): «**Геном** вирусов имеет отрицательную полярность и **не кодирует белки**». В этом же п. 2.2 автор пишет: «Порядок расположения генов в направлении от 3' к 5'-конце в геноме MV-вирусов консервативен и является способом регуляции транскрипции, причем **основные белки** находятся на 3'-конце или рядом с ним, а

большой (L) ген расположен в 5'-конце». К сожалению, примеров такого вольного обращения с терминами и понятиями в диссертационной работе много.

4. На стр. 23 автор пишет: «**Сходство организации геномов вирусов** семейств *Ortomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* и вируса ЛДР отряда *Mononegaverales*: функций отдельных белков: гемагглютинина (НА) и гликопротеинов (Gn, Gc), нуклеопротеина (NP и NC), неструктурных белков (NS1 и NSs), белков слияния (NSm2; F и HA2) позволяют использовать **вирусы гриппа и болезни Ньюкасла** в качестве модели при отработке отдельных этапов создания средств диагностики и специфической профилактики **ЛДР** в виду высокой ее опасности вируса ЛДР для человека». Следует пояснить, что геном у вирусов семейства *Paramyxoviridae* – единая одноцепочечная линейная нефрагментированная РНК (в виде рибонуклеокапсида), а геном у вируса ЛДР – три фрагмента одноцепочечных нековалентно комплементарно спаренных циркулярных РНК (рибонулеокапсидов). Следовательно, каждый фрагмент содержит строго определенный набор генов, что означает невозможность использовать вирус болезни Ньюкасла в качестве модели ЛДР.

5. Почему в диссертационной работе, целью которой «является разработка средств и методов ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла; подходов создания средств и стратегий специфической профилактики особо опасных инфекций (на примере ЛДР и гриппа птиц H5) на основе достижений молекулярной биологии», в п. 4.1.2 и п. 4.1.3 автор рекомендует нам ознакомиться с «Методическими положениями по получению моноспецифической сыворотки к рекомбинантному белку р30 вируса африканской чумы свиней (АЧС)» или с патентом на изобретение «Способ получения моноклональных антител к белку р30 вируса АЧС с использованием рекомбинантных конструкций»? Ведь на стр. 89 читаем: «Иммунизация - самый «творческий» этап; эффективность которой определяет в наибольшей степени конечный успех всего процесса получения моноклональных антител. **Не существует какого-либо единого протокола иммунизации**, так как выбор схемы иммунизации и использование различных приемов, повышающих ее эффективность, зависит от цели получения МКА и **свойств конкретного антигена**».

6. Описание таблицы 4 (стр. 85-86) не соответствует её содержанию. Например, в таблице в качестве антигена есть только «гемагглютинин НА5» и «NP

вируса гриппа А», и **НЕТ** «других подтипов вируса гриппа птиц и гетерологичных гемагглютинирующих вирусов, возбудителей болезней птиц (НБ и ССЯ-76)».

Кроме того, там же автор пишет (цитата): «...**антитела моноспецифической сыворотки** к HA5 вируса гриппа птиц с активностью в РЗГА 1:400-1:1600; ТФ ИФА - 1:6 тыс.1:12-16 тыс. взаимодействовали со всеми, имеющимися штаммами гомологичного подтипа и **не вступали в реакцию с антителами сывороток** к другим подтипам вируса гриппа птиц и гетерологичным гемагглютинирующим вирусам, возбудителям болезней птиц (НБ и ССЯ-76)...».

7. Также содержимое таблиц 5, 6, 12, 31, 40 не совпадает с их последующими описаниями.

8. Не ясно, на что указывают стрелки на рис. 4В, 4D, 4Е, 4G и 4Н. Нет пояснения к рис. 4Н. Аналогичное замечание по рис. 7 (стр. 92), 9 (стр. 96), 13 (стр. 11), 14 (стр. 114).

В описании к рис. 6 на стр. 90 автор пишет: «Как видно из результатов, представленных диаграммой рисунка 6, при **внутриселезеночном введении** (праймирование) ДНК-плазмиды, несущей вставку гена, кодирующего гликопротеин Gp вируса ЛДР, индуцируют гуморальный иммунный ответ и **обеспечивают синтез более высокого уровня специфических антител 1:2400-1:3000 к 4-5 суткам после введения по сравнению с внутримышечным введением (7 суток - 1:600-1:1000)**. Повторная внутримышечная и внутриселезеночная ДНК-иммунизация через 15 суток после первого введения не привела к значительному увеличению титра антител». Во-первых, на рисунке нет данных титров в указанные сроки, во-вторых, на 7-е, 15-е и 25-е сутки у мышей второй группы (иммунизированы внутриселезеночно рекДНКpCI-neo/Gn/2/2) титры специфических антител одинаковые - **1:2400**, и не достигают значений 1:3000.

9. Невозможно разобраться, где и что на рисунке 11.

10. Дважды, слово в слово, дано описание результатов таблицы 23 – на стр. 152 и на стр. 154.

11. Очень не удобно изучать материалы диссертационной работы, когда рисунок и подписи к нему находятся на разных страницах (см. рис. 4, 6, 22).

12. Список сокращений не полный.

13. Очень сложно воспринимается информация!

14. В тексте встречаются стилистические и орфографические ошибки, опечатки.

Заключение.

Диссертационная работа Капустиной Ольги Владимировны по актуальности, новизне, практической значимости, объему выполненных исследований и степени внедрения в научно-исследовательскую практику отвечает требованиям ВАК Минобрнауки России, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент

профессор кафедры радиобиологии и вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрина федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23) доктор биологических наук

Подпись Е.И. Ярыгиной удостоверяю:
Учёный секретарь учёного совета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» кандидат сельскохозяйственных наук



Е.И. Ярыгина

11.2016г.

С.С. Маркин