

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
Капустиной О.В. «Разработка и совершенствование средств
и методов контроля особо опасных инфекций, вызванных
вирусами порядка *Mononegavirales*», представленной на
соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по
специальности 06.02.02 - Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с
микотоксикологией и иммунология**

Пристальное внимание ветеринарной службы, органов здравоохранения и научной общественности приковано к особо опасным, в том числе зооантропонозным болезням, возбудителей которых относят к порядку *Mononegavirales*, объединяющего вирусы семейств *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Deltaviridae*, *Ortomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, геном которых представлен отрицательной одноцепочечной РНК (Bridgen A., et al., 1996; Strauss J.H. et al., 2008; ICTV, 2013].

Одним из представителей этого порядка является вирус гриппа птиц, который относят к семейству *Ortomyxoviridae*. Актуальность этого вируса связана с наличием всех известных на сегодняшний день подтипов вируса гриппа А, наличием его резервуара в природе, поддерживаемого птицами водного и околоводного пространства, способностью вызывать эпизоотии среди диких и домашних птиц, а также отдельных подтипов (А(Н5N1), А(Н5N6), А(Н7N9)), способных инфицировать людей с развитием тяжелых форм заболевания и летальными исходами (Abdo-Salem S. et al., 2011; Alexander D.J. et al., 2012; Diel F.G. et al., 2012; McCauley J. et al., 2012; Peiris J.S. et al., 2009; Carroll S.A. et al., 2011). По данным Всемирной Организации Здравоохранения, на сегодняшний день детектированы 800 случаев инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(Н7N9), 318 из которых

Вход. № 37
«01» декабря 2016 г.
подпись

закончились летальными исходами, и вирусом гриппа птиц А(Н5N1) – 856 случаев, 452 из которых – с летальными исходами. Кроме того, вирусы гриппа птиц представляют определенную угрозу в формировании новых вариантов с пандемическим потенциалом. В последние годы в США, Франции и Китае был идентифицирован новый вирус гриппа у свиней и крупного рогатого скота, который определен как вирус гриппа типа D (Jiang W.M. et al, 2011;2014.).

К представителю этого порядка можно отнести и вирус болезни Ньюкасла семейства *Paramyxoviridae*. Актуальность этого вируса связывают с появлением и распространением штаммов, относящихся к V-VII генотипам второго генетического класса, большинство из которых способны размножаться и вызывать болезнь среди птиц, вакцинированных коммерческими препаратами, что делает их потенциально опасными (Karczynski D.R. et al., 2005; Saifetal Y.M., 2004; Nichneretal S.B., 2004; Лагуткин Н.А. и др., 2005; Борисов А.В. и др., 2010; Силко Н.Ю. и др., 2013 и др.). Вирус болезни Ньюкасла может инфицировать людей с развитием гриппоподобного заболевания и конъюнктивита. Заболевание чаще всего протекает в легкой и средне-тяжелой формах.

Особый интерес представляет вирус лихорадки долины Рифт (ЛДР) семейства *Bunyaviridae*, который известен с 1912г. ЛДР отличает от других арбовирусных зоонозов способность инфицировать животных не только через переносчиков, но и при непосредственном контакте с инфицированным материалом через аэрозоль. Вирус патогенен для широкого круга жвачных животных и способен вызывать массовые аборты и практически поголовную гибель молодняка. В последние годы отмечено распространение ЛДР на свободные от нее территории (о. Мадагаскар, 1991г; Аравийский п-ов, 2000-2001гг.; Коморские о-ва, 2007; завозные случаи в Германии 2010г., Китае 2016г.); описаны драматические события в Южной и Западной Африке (Bouloy M., Flick R., 2009; Jones K.E, et al., 2008; Bird B.H. et al., 2009; NICD, 2010). Для человека отмечена эволюция вируса ЛДР от мало- до

высокопатогенного, инфицирование которым сопровождается развитием тяжелого геморрагического и менингоэнцефалического синдромов, сравнимых с заболеваниями, вызванными представителями группы особо опасных возбудителей (В.А. Маркин, 2015). Летальность у людей в период вспышек, вызванных ЛДР, может достигать 1,0%, при геморрагических формах – до 50%. Кроме того, ЛДР представляет интересную модель для изучения в качестве примера генетической стабильности арбовирусов в природе.

Угроза тяжелых последствий появления и распространения экзотических трансграничных болезней особо остро стоит ввиду не достаточно эффективных лицензированных средств их оперативной диагностики, специфической профилактики и лечения (www.who.int/mediacentre; ФАО, 2012; OIE, 2013). В тоже время, рекомбинантные и гибридные технологии являются в настоящее время неотъемлемой частью при разработке диагностических тест-систем и средств профилактики инфекционных болезней, обеспечивая их безопасность, высокую чувствительность и эффективность и позволяя создавать уникальные препараты стандартизированных моноклональных антител (МКА) и рекомбинантных аналогов вирусных белков (Медуницин Н.В., 2005; Чубухова О.В., 2008; Van Vuren J., 2010; Найхин А.И., 2012). Изучение механизмов иммунитета также представляет одну из важных задач при разработке высокоэффективных средств профилактики инфекционных болезней.

Сходство организации геномов и функций отдельных белков позволяют использовать представителей семейств *Orthomyxoviridae* (вирусы гриппа птиц) и *Paramyxoviridae* (вирус Ньюкасла) в качестве модели при отработке отдельных этапов создания средств и методов диагностики и специфической профилактики представителя семейства *Bunyaviridae* – вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР) ввиду высокой опасности ее возбудителя для человека.

Все вышесказанное послужило основанием для проведения исследований по разработке новых и совершенствованию существующих средств и методов

ранней диагностики этих болезней, их мониторинга и специфической профилактики.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить **следующие задачи**: изучить реактивность рекомбинантных белков и плазмид; усовершенствовать способ получения моноклональных антител узкой специфичности; разработать и усовершенствовать методы ранней диагностики и серологического мониторинга; определить штамм вируса ЛДР в качестве кандидата в вакцинный; разработать оптимальные условия индукции раннего противовирусного иммунитета; разработать схему системных подходов обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения особоопасных инфекций.

Диссертационная работа Капустиной О.В. изложена на 306 страницах, иллюстрирована 42 таблицами и 25 рисунками; оформлена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, осуждения результатов, выводов, практических предложений. Указатель литературы включает 630 работ, в том числе зарубежных авторов - 536. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их научную новизну и практическую значимость.

В главе «**Обзор литературы**» на основании материалов отечественных и зарубежных исследователей подробно изложена эпизоотическая ситуация в мире по ЛДР, гриппу птиц типа А и болезни Ньюкасла, приведена их современная классификация, охарактеризованы структура и свойства их белков. Большое внимание уделено существующим методам диагностики особо опасных инфекций, в том числе, их недостатки для оперативной диагностики; использованию рекомбинантных белков в качестве специфических антигенов, а также гибридной технологии. Особый интерес представляют исследования по противовирусному иммунитету и подходам в разработке вакцин нового поколения. В заключении обоснована необходимость проведения настоящей работы.

Глава «Собственные исследования» начинается с раздела «Материалы и методы», в котором подробно описаны методы, структура и объем проведенных исследований, представлены подходы к статистической обработке полученных результатов.

«Результаты собственных исследований» включает несколько разделов, посвященных решению отдельных задач работы.

Раздел 4.1 посвящен изучению возможности применения генно-инженерных конструкций (рекомбинантных ДНК) и рекомбинантных белков для получения высокоактивных сывороток и моноклональных антител заданной специфичности. С этой целью использовали рекомбинантную ДНК, несущую вставку полноразмерного *gn*-гена и соответствующую рекомбинантному аналогу гликопротеина G_n вируса ЛДР. Получение высокоспецифичных моноклональных антител расширяет возможности их применения для изучения тонкой структуры вирусов и их репродукции, иммунохимического и функционального анализа отдельных белков, антигенных свойств рекомбинантных белков и их экспрессии, а также разработки иммуноферментных тест-систем.

Раздел 4.2 посвящен методам ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла. В разделе представлены результаты разработки ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией и определения ее специфичности с использованием различных препаратов РНК вируса ЛДР и гетерологичных вирусов; изучены различные форматы ИФА для выявления антигенных детерминант нуклеопротеина вирусов; специфических антител к изучаемым вирусам. Использование рекомбинантного аналога NP вируса ЛДР обеспечивает повышение чувствительности и специфичности метода, дифференциальную диагностику инфицированных животных естественным путем, привитых инактивированной или ДНК_{G_n/G_c} вакцинами в угрожаемой по ЛДР зоне. Использование рекомбинантных белков в качестве специфических диагностических реагентов гарантирует безопасность,

стандартность, высокую специфичность и низкий фоновый уровень разрабатываемых тест-систем иммуноанализа.

Раздел 4.3 посвящен результатам создания эффективных вакцин и стратегии вакцинации в отношении особо опасных инфекций на примере ЛДР и гриппа птиц подтипа А/Н5. Представлены результаты изучения иммунобиологических свойств штаммов вируса ЛДР из коллекции ВНИИВВиМ, режимов их культивирования (культуры клеток, центрифугирования, методы, время), молекулярная характеристика. Результаты позволили выбрать штамм «1974-ВНИИВВиМ» для его дальнейшего изучения в качестве кандидата в вакцинные. Представлены результаты изучения инактиванта и оптимальный режим инаktivации штамма вируса ЛДР «1974-ВНИИВВиМ», иммунобиологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика которого обеспечивают эффективность, экологическую безопасность производства и применения его для инаktivированной вакцины. На лабораторной модели (аутбредные белые мыши) экспериментально продемонстрирована эффективность стратегий прайм-бустерной иммунизации против ЛДР и гриппа птиц подтипа А/Н5 на основе использования рекомбинантных ДНК, кодирующих иммунодоминантные белки вирусов гриппа птиц (НА5 и NP) и ЛДР (Gn и Gc), ГОА-сорбированного инаktivированного антигена вируса ЛДР. Изучена эффективность различных систем доставки иммуногена. Прайм-бустерная иммунизация рекомбинантными ДНК_{Gn/Gc} обеспечивала развитие раннего специфического иммунитета у привитых животных, начиная с 7 суток (срок наблюдения); при ДНК-иммунизации экспрессия генов и синтез гликопротеинов вируса ЛДР приводили к активации Т- и В-клеток, способствовали ранней генерации клеток, имеющих фенотип и функции клеток памяти. Представлены результаты изучения иммунитета, индуцируемого экспериментальными вакцинами различных типов: живой аттенуированной, инаktivированной и ДНК-вакциной. На примере вируса

ЛДР разработана схема системных технологий, определяющая на основе данных среднесрочного (5-6 мес.) прогнозирования, комплексный подход по обеспечению готовности противодействия в случае угрозы возникновения особо опасных инфекционных болезней (экзотических, новых и малоизученных), которая предполагает быстрое развертывание промышленного производства необходимого количества средств диагностики и специфических вакцин.

В Разделе 5, «Обсуждение результатов», Капустина Ольга Владимировна подводит итоги проведенных исследований и приводит данные по изученным направлениям, опубликованные отечественными и зарубежными учеными.

Выводы обоснованы и в целом логически вытекают из результатов проведенных исследований.

Научно-практическое значение работы подтверждается разработкой 6 методических рекомендаций (положений), утвержденных академиком-секретарем Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии А.М. Смирновым: «Методические указания по выявлению нейраминидазы N1 вируса гриппа птиц методом ПЦР», протокол №3, Покров, 28.09.2006 г.; «Методические указания по выявлению гемагглютинина H5 вируса гриппа птиц методом ПЦР», протокол №3, Покров, 28.09.2006 г. «Методические рекомендации по выявлению антигенов вируса гриппа птиц H5 и H7 сероподтипов прямым «сэндвич»-вариантом ТФ ИФА на основе МКА к гемагглютинину соответствующего подтипа», протокол №3, Щелково, 29.10.2009г.; «Методические положения по выявлению РНК вирусов болезни Найроби и ЛДР методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени», протокол №4, Покров, 23.09.2011; «Методические положения по получению моноспецифической сыворотки к рекомбинантному белку р30 вируса АЧС», протокол №4, Покров, 23.09.2011; «Методические положения

по получению МКА к структурному белку р30 вируса АЧС с использованием «прайм-бустерной иммунизации», протокол №4, Покров, 23.09.2013.

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

Основные результаты работы опубликованы в 50 научных работах, в том числе 13 - в рекомендованных ВАК для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций. Приоритетность результатов исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретения.

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 (2009-2013гг.); представлены на международных и региональных научно-практических конференциях: Международной Российско-Американской научно-практической конференции г. Москва «Болезни диких животных» 2007г.; Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных», Ставрополь, 2012г., «Актуальные вопросы ветеринарной медицины Сибири», Улан-Уде, 2013г.; на конференции «Биоиндустрия 2013» в рамках Петербургского международного форума «Здоровье», Санкт-Петербург, 2013г. Практические аспекты применения научных разработок были представлены за период 2002-2014гг. на семинарах в «Учебном центре по подготовке, переподготовке и повышению квалификации специалистов ветеринарных лабораторий субъектов Российской Федерации» ФБГУ ЦНМВЛ (г. Москва).

В автореферате в традиционно сжатой форме приведены: актуальность исследования, степень разработанности проблемы, цель работы и основные задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследований, основные

положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация работы, а также изложены основные результаты экспериментальных исследований, обосновывающих выводы диссертации.

Однако при детальном ознакомлении с материалами диссертации возникли некоторые замечания, вопросы и пожелания.

1. Автором сделаны 10 выводов, содержащих научную новизну и отражающих содержание результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы. Тем не менее, некоторые из них могли бы быть более информативными и содержать конкретные результаты, полученные автором.

2. Несмотря на хороший стиль, профессиональный язык изложения, следует отметить наличие в тексте диссертации сложных, длинных предложений, понятие смысла которых затрудняет прочтение и осмысление текста; имеются отдельные стилистические, пунктуационные ошибки, опечатки, а также встречаются неудачные выражения типа: «у микрочипов...», «более вирулентных...» и т.п.

3. В тексте на стр. 31-33 гликопротеины вируса ЛДР обозначены в одном случае G_n и G_c, в другом G1 и G2; встречается обозначение инфекционной активности вируса ЛДР то в MICLD_{50/см³}, то в MLD_{50/см³}. В разделах 4.1.2 и 4.1.3 автор ссылается на методические рекомендации и патент на получения сыворотки и МКА к белку р30 вируса АЧС, не относящегося к теме диссертационной работы.

4. Перегруженность таблиц №№ 4, 17, 22, 23, 24 параметрами и объектами исследований, что осложняет восприятие и оценку данных; в таблице 23 не показаны данные исследования сывороток в непрямом ТФ ИФА; обнаружен, без нарушения последовательности повествования, сбой нумерации со страницы 144; в таблице №30 отсутствует примечание, объясняющее свойства и характеристику используемых проб.

5. В разделе 4.3.1.5 определения полноты инактивации вируса ЛДР не понятно, что автор имел ввиду под термином «гомологичная культура

клеток...»? В разделе 4.3.2 п.п. 4.3.2.1 не достаточно полно освещен вопрос приживляемости контрольного штамма вируса ЛДР в организме привитых животных.

В качестве рекомендаций – желательно провести испытания индукции обоих звеньев иммунитета при применении предлагаемой гетерогенной прайм-бустерной иммунизации на целевых животных.

Сделанные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы и не влияют на общую положительную оценку полученных результатов.

Вопрос. Проводил ли автор диссертационной работы сравнительный анализ чувствительности и специфичности разработанных в рамках настоящей работы тест-систем ОТ-ПЦР с рестрикционным анализом, мультиплексной ОТ-ПЦР и ИФА с коммерческими системами, применяемыми как в России, так и зарубежом. В чем их преимущества и если есть – недостатки.

Заключение.

Диссертация Капустиной О. В. «Разработка и совершенствование средств и методов контроля особо опасных инфекций, вызванных вирусами порядка *Mononegavirales*» является законченной *научно-квалификационной* работой, в которой содержится решение важной задачи по получению иммунореагентов для разработки безопасных высокочувствительных тест-систем иммуноферментного анализа; разработке новых и совершенствованию существующих средств и методов ранней диагностики и специфической профилактики, основанной на применении отдельно или в комбинации традиционных вакцин и вакцин нового поколения, обеспечивающих контроль появления и распространения таких особо опасных инфекций как ЛДР, грипп птиц, болезнь Ньюкасла.

Диссертационная работа Капустиной Ольги Владимировны по актуальности темы, новизне и практической значимости полученных

результатов, объему выполненных исследований, степени внедрения в научно-исследовательскую практику отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г., № 842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016г. № 335), предъявляемым к докторским диссертациям, так как она решает научную проблему контроля появления и распространения особо опасных, в том числе экзотических возбудителей зооантропонозных заболеваний, является законченной, актуальной, современной научной работой. Она имеет важное значение для ветеринарии.

Автор работы Капустина Ольга Владимировна заслуживает присуждения ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Зав. лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа
Института вирусологии им. Д.И.Ивановского
ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России
доктор медицинских наук

Е. И. Бурцева

Адрес: ул. Гамалеи 18, 123098, Москва, Россия
Телефон: тел. (499) 190-3046
E-mail: elena-burtseva@yandex.ru

