



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру. Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.
Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

« 29 » ноября 2016 г.
№ 01-07 / 8893

Вход. № 38
« 01 » декабря 2016 г.
подпись

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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 специальности 06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Актуальность темы

Большую угрозу в настоящее время представляют трансграничные особо опасные инфекционные заболевания, в том числе зооантропонозные, такие как лихорадка долины Рифт (ЛДР), высокопатогенный грипп птиц (ВПП) и болезнь Ньюкасла (НБ), относящиеся к порядку Mononegavirales. Широкое распространение указанных инфекций в различных странах мира выраженная изменчивость возбудителей инфекционных заболеваний свидетельствуют о необходимости проведения исследований по разработке и совершенствованию методов диагностики и средств профилактики. Такая работа связана с использованием различных методических подходов современного уровня, в том числе молекулярных, рекомбинантных технологий, позволяющих изучать отдельные компоненты вириона, изменения в его структуре.

Вирус болезни Ньюкасла относится к роду Avulavirus семейства Paramyxoviridae имеет один иммуно- и серотип. Однако, новые вирулентные геномы появляются в связи с изменением генетической последовательности в результате их одновременной циркуляции и многообразие видов птиц, восприимчивых к болезни Ньюкасла. Опасность инфекции заключается в том, что вирулентные штаммы НБ могут инфицировать вакцинированных

птиц при отсутствии клинических признаков заболевания, что подтверждено в ряде стран со вспышками болезни и гибелью всех птиц, несмотря на применение вакцин из штамма «La Sota».

Изоляты, выделенные при возникновении заболевания на Украине, Казахстане и Киргизии, относятся к велогенным генотипам и являются опасными для территории РФ в связи с наличием последовательности сайта расширения F белка, определяющим патогенность вируса БН.

Рядом исследователей показано тождество аминокислотной последовательности белков вируса болезни Ньюкасла между полевыми изолятами и штаммами «La Sota» и B1, свидетельствующие об их существенном отличии от вакцинных штаммов.

Сходство организации генома, функций основных вирусных белков представителей Bunya-, Orto-, Paramixoviridae послужили основанием для использования автором вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла в качестве модели для разработки средств и методов диагностики и профилактики ЛДР.

Необходимость проведения таких исследований обусловлена наличием общих свойств в геномной организации элементов для репликации и экспрессии генов указанных инфекций по степени опасности, социального значения и экономическому ущербу и являются важной проблемой в ветеринарии и здравоохранении.

На ЛДР, как особо опасную инфекцию, обращено внимание с 1977-78гг., когда в Египте вызвала обширную эпизоотию среди овец, КРС и других домашних животных с высокой заболеваемостью, абортами, летальностью, а также заболеванием 200 тыс. людей с течением болезни в тяжелой форме, сопровождавшейся гибелью 100 человек. Помимо передачи комарами вирус ЛДР может передаваться путем контакта с различными материалами, кровью от больных животных с высоким количественным содержанием возбудителя болезни. Эпизоотии ЛДР регистрируются с интервалом 5-15 лет.

Учитывая сходство организации геномов вирусов семейства *Orthoroviridae*, *Paramixoviridae* и вируса ЛДР Капустина О.В. в обзоре литературы представила характеристику вирусов гриппа А, болезни

Ньюкасла и вируса лихорадки долины Рифт, диагностику заболеваний, вызванных указанными возбудителями инфекций, использование рекомбинантных белков в качестве специфических антигенов, гибридную технологию и применение моноклональных антител. Подробно изложены данные о противовирусном и поствакцинальном иммунитете, включающие особенности иммунного ответа методом повышения иммуногенности вакцинных препаратов при ДНК-иммунизации. Отдельным разделом представлены история создания средств специфической профилактики лихорадки долины Рифт, а также стратегия контроля лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла.

Оценка содержания работы

Основной целью исследований автора была разработка средств и методов ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла и на основе достижений молекулярной биологии, подходов создания средств и стратегий специфической профилактики особо опасных инфекций.

В результате проведенных исследований изучена специфичность и антигенная активность полученных рекомбинантных белков, которые взаимодействовали со специфическими антителами в сыворотках крови животных и иммуноспецифических жидкостях. На мышах и кроликах отработана оптимальная доза введения рекомбинантного белка, достаточного для получения в дальнейшем моноклональных антител.

Разработан метод получения гипериммунной сыворотки на основе выбранной дозы введения рекомбинант-ДНК и рекомбинантного белка к иммунодоминантным диагностически значимым структурным белкам различных вирусов. В результате получены сыворотки с антителами, реагирующими с антигеном соответствующего вируса в различных серологических реакциях. Взаимодействие сывороточных антител и антигенов гриппа птиц, АЧС, ЛДР, их специфичность и активность определяли также методом непрямого пероксидазного иммуноцитохимического ИФА в иммуноблоттинге.

На основании полученных результатов в дальнейшем получены МКА к гликопротеину G_n вируса ЛДР с использованием рекомбинантных конструкций для выявления антигенных детерминант вирусного белка G_n в инфицированных материалах, репродукции вируса *in vitro* и контроля антигенности вирусосодержащего сырья при изготовлении вакцин против ЛДР. Более эффективным был метод внутриселезеносной инъекции антигенов по сравнению с внутримышечным, что подтверждалось накоплением титра антител, стимуляцией и дифференциацией лимфоцитов селезенки.

В опытах по гибридизации клеток линии SP 2/0 Ag 14.1 и спленоцитов мыши, иммунизированной внутриселезеночной инъекцией ДНК-плазмы р Cl-neo/gh/212 отмечено клонообразование, показавшее наличие значительной иммуногенности плазмы, а полученные клоны гибридом специфически взаимодействовали с рекомбинантным белком G_n и с антигеном поверхностных белков вируса ЛДР.

Для получения направленного слияния соматических клеток и увеличения количества образовавшихся гибридных клеток, способных продуцировать специфические МКА проведены исследования эффективности сенсibilизации миеломной линии клеток мыши SP 2/0 Ag 14.1 рекомбинантным белком G_n перед опытом гибридизации. Было установлено начало клонообразования на 5-7 сутки после гибридизации.

Для скрининга антителопродукции клонами гибридом разработан экспрессный и чувствительный метод с использованием частиц латекс, сенсibilизированных рекомбинантным белком G_n вируса ЛДР.

При разработке реакции латекса агглютинации отработаны оптимальные условия сенсibilизации рекомбинантными белками поверхности латексных частиц. О сорбции антигена на поверхности частиц судили по агглютинации сенсibilизированных частиц латекса специфическими антителами сывороток к вирусу ЛДР. Результаты изучения специфичности и чувствительности метода на основе рекомбинантного белка показали возможность его использования для быстрого анализа антителопродукции клонами гибридом и селекции. Метод признан

экономичным и простым для первичного скринирования антителпродукции гибридами.

В связи с потерей хромосом гибридами автором проведена работа по получению гибридом с заданным спектром. Методом селекции гибридом получено 12 клонов, продуцирующих МКА к гликопротеину Gp, специфичных к антигенным детерминантам вируса ЛДР и не вступали в реакцию с рекомбинантным нуклеокапсидным белком (NC) вируса ЛДР. Результаты, полученные при иммунизации ДНК-конструкциями и рекомбинантными белками показали, что МКА являются специфичными в различных видах иммунологического анализа иммуноблотт, иммуноцитохимический анализ, различные варианты ТФ ИФА.

Вышеизложенное свидетельствует о возможности использования МКА для изучения структуры вирусов и особенности их репродукции иммунохимического и функциоанального анализа отдельных белков вирусов, антигенности рекомбинантных белков, их экспрессии, разработки диагностических иммуноферментных тест-систем.

В дальнейшем разработана ОТ-ПЦР для идентификации эпизоотического и аттенуированного штаммов ЛДР, тест-системы для выявления геномов вирусов болезни Найроби и ЛДР, которая позволила выявлять в пробах инфицированного материала геномы вирусов ЛДР и болезни Найроби с высокой аналитической чувствительностью.

С целью усовершенствования методов ранней диагностики гриппа, болезни Ньюкасла и ЛДР автором изучен тропизм штаммов вируса гриппа и ЛДР к различным культурам клеток – МДСК и ПСГК, а также на эмбрионах кур, в том числе вирулентных и слабовирулентных, а также вируса ЛДР в культурах клеток ПС, CV-1. Было установлено методом ПЦР, ИФА, что конъюгаты МКА, специфичные к гликопротеину и гемагглютнину H5 и H7 вируса гриппа птиц и нуклеопротеину вируса болезни Ньюкасла способны выявлять их антигенные детерминанты через 10-24 часа после инфицирования до проявления ЦПД. Достоверность полученных результатов подтверждалась через 2-3 суток после заражения в РНГА, РГА и РТГА, а также в ТФ ИФА, что свидетельствовало о возможности использования

указанных культур для ранней диагностики гриппа птиц, болезни Ньюкасла и ЛДР, а также получения антигенов, что имеет преимущество по времени выделения перед методом выделения возбудителей экзотически и трансграничных болезней.

Для идентификации и дифференциации гриппа птиц и болезни Ньюкасла Капустиной О.В. разработана тест-система двухсайтового ТФ ИФА на основе моноклональных антител, которая обладала высокой чувствительностью и специфичностью и позволяла выявлять инфицированный материал с титром 2,0-2,5 Ig ЭЛД/ЭИД_{50/см³}. Отработан оптимальный режим лиофильной сушки конъюгатов, специфических моноклональных антител и вирусных антигенов. Указанные компоненты вошли в состав набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла, с помощью которого были исследованы материалы в различных регионах Российской Федерации и Абхазии. В дальнейших исследованиях показана возможность использования пероксидазы хрена в качестве метки в иммунохемилюминисцентном анализе, что привело к снижению фонового уровня с гетерологичными антигенами, повышению чувствительности реакции.

С целью серологического мониторинга особо опасных инфекционных болезней, гриппа птиц и болезни Ньюкасла разработан непрямой вариант ТФ ИФА для выявления специфических антител, который показал наличие высоких титров специфических антител к вирусам ГП и НБ в сыворотках крови птиц и антител к вирусу гриппа А в сыворотке крови диких свиней в различных регионах РФ, что свидетельствовало о циркуляции вируса среди диких животных. Однако по сравнению с указанным методом автор показал, что прямой конкурентный ТФ ИФА на основе рекомбинантного белка является простым, быстрым, удобным и экономичным методом. При этом чувствительность метода по сравнению с коммерческим набором превышает в 1,5-2 раза и снижает фоновый уровень.

При разработке непрямого ИФА для выявления специфических антител к вирусу ЛДР проведены исследования по возможности использования рекомбинантных аналогов структурных белков NC, Gn/Gc вируса ЛДР.

Получены результаты, показавшие отсутствие перекрестной реакции при постановке ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков с антителами к гетерологичным вирусам болезни Найроби, Акабане, Арумовоти гриппа А. А используя рекомбинантный белок NS в качестве специфического антигена, возможна дифференциация инфицированных животных и иммунизированных вакциной, содержащей нереплицирующийся вирус ЛДР. На основании проведенных исследований сделан вывод о том, что разработанные методы иммуноанализа являются высокоспецифичными и могут быть использованы для диагностики ЛДР, серологических исследований.

Учитывая высокую опасность ЛДР для животных и человека было важно изучить чувствительность белых мышей и золотистых хомячков к различным штаммам вируса лихорадки долины Рифт.

Установлено, что штамм «Энтеббе» обладал высокой вирулентностью и может быть использован для контроля иммунитета у иммунизированных животных.

Для изучения возможности создания иммуногенных препаратов Капустина О.В. изучала репродукцию различных штаммов вирусов ЛДР в различных культурах клеток, определяла оптимальную множественность заражения культуры клеток ВНК-21/13 и ПС. По генетической стабильности, инфекционной активности, иммуногенной активности, безвредности для мышей отобран штамм «1974-ВНИИВВиМ» для дальнейшей работы. Определены условия культивирования вируса различными методами. Для технологического контроля процесса накопления антигенов вируса ЛДР разработана РН ГА с использованием эритроцитарного диагностикума на основе МКА к гликопротеину Gn, которая по чувствительности уступала в 4-8 раз ТФ ИФА, однако позволяла получать результаты в течение 1-2 часов. В качестве критерия антигенности и иммуногенности препарата служила условная единица, содержащая в 1 см^3 64 ГАЕ, обеспечивающая 50% защиту от заражения.

Отдельным разделом представлены результаты исследований эффективности применения ДНК-иммунизации для индукции раннего

иммунитета, в том числе протективного, которые показали, что двукратная внутримышечная гомологичная прайм-бустерная ДНК-иммунизация инкапсулированной рекомбинантной плазмидой р InfNA5 отдельно или в совокупности с р InfNP индуцировала развитие раннего иммунного ответа, начиная с 7 суток.

Большая работа проведена по изучению иммунного ответа при ДНК-иммунизации на примере использования ДНК-конструкций, кодирующих гликопротеины вируса ЛДР. Получены данные, свидетельствующие о значительном нарастании сывороточных антител только после третьего введения иммуногена, снижения фонового уровня реакции ТФ ИФА с антигенами гетерологичных вирусов, что является показателем усиления аффинности и авидности синтезируемых антител.

Кроме образования специфических антител препараты рекомбинантных плазмид стимулировали генерацию CD8 и CD4 Т- и В-клеток и других составляющих клеточного иммунитета, который преобладал в течение первых 7 суток после введения рекомбинантных плазмид.

Установлена более высокая эффективность ДНК-иммунизации при двух- и трехкратном введении препарата, а также инактивированного антигена и цельновирусного сорбированного на ГОА антигена вируса ЛДР штамма «1974 – ВНИИВВиМ», что имеет большое значение при выборе средств для иммунизации животных.

На основании результатов, проведенных исследований автором предложена стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации с использованием различных систем доставки иммуногена, которая обеспечивает развитие полноценного иммунного ответа в короткие сроки и применяется для профилактики особо опасных заболеваний при угрозе их возникновения. Разработана «Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) ЛДР», применение которой позволит в короткие сроки провести экстренное развертывание создания и промышленного производства средств диагностики и специфической иммунизации против особо опасных экзотических и малоизученных инфекций на примере ЛДР.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследований.

Вышеизложенное свидетельствует о большом объеме проведенных исследований на основе достижений современной молекулярной биологии и биотехнологии.

Получены высокоактивные специфические МКА к G_n/G_s вируса ЛДР, разработаны методы ОТ ПЦР и ИФА для ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла, тест-система ИФА «Набор препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла», СТО и инструкция по применению.

На аутбредных белых мышах проведены исследования по разработке методов оценки качества вирусосодержащего материала и инактивированного антигена вируса ЛДР.

В результате ДНК-иммунизации подтверждено повышение иммунологической эффективности инактивированного антигена вируса ЛДР, а стратегия прайм-бустерной иммунизации обеспечивает дифференциацию инфицированных и вакцинированных животных с применением ТФ ИФА на основе рекомбинантного нуклеопротеина и соответствующих МКА. На основе применения рекомбинантных плазмид и белков возможно создание средств диагностики и профилактики ЛДР.

Материалы исследований использованы для разработки 6 методических указаний.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждена их статистической обработкой с помощью Microsoft Office Excel 2007, актами комиссионных испытаний представленных в виде приложений к диссертации. Научные положения, выводы и рекомендации основаны на большом объеме экспериментального материала.

Основные положения диссертационной работы доложены на заседаниях Ученого совета ГНУ «ВНИИВВиМ» Россельхозакадемии, на секции инфекционная патология Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии и региональных научно-практических конференциях и семинарах.

Научная новизна результатов исследований заключается в создании средств и методов ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла, разработки методов профилактики ЛДР и гриппа птиц подтипа H5 и схемы научно-обоснованных мер по контролю ЛДР. С этой целью получены МКА направленной специфичности, способных выявлять антигенные детерминанты гликопротеина G_n вируса ЛДР.

Разработаны различные форматы ИФА, способные выявлять антигенные детерминанты нуклеопротеина вирусов ЛДР, гриппа птиц, болезни Ньюкасла, специфические антитела к этим вирусам, а использование рекомбинантного аналога NP вируса ЛДР позволяет дифференцировать инфицированных животных и привитых инактивированной или ДНК G_nG_c вакцинами.

Использование ОТ-ПЦР позволяет выявлять геном вируса ЛДР и дифференцировать вирулентный и аттенуированный штамм «1974 – ВНИИВВиМ» вируса ЛДР, может быть использован для изготовления инактивированной вакцины.

Новизна исследований подтверждена патентами на изобретение.

При анализе материалов диссертации возникли вопросы, на которые хотелось бы получить ответ. Так, в процессе изучения молекулярной характеристики вируса ЛДР выявлены нуклеотидные замены у отдельных штаммов, которые не влияют на синтез вируснейтрализующих антител. Как эти замены влияют на протективные свойства антигена, в чем они выражаются, какова зависимость между вируснейтрализующими, вирусспецифическими антителами и устойчивостью животных к заболеванию.

В разделе разработка лабораторных методов сырья и инактивированного антигена лихорадки долины Рифт представлены результаты иммуногенной активности инактивированного антигена на мышах и овцах при парентеральном введении антигена двукратно с интервалом 14 дней по 0,5 и 2 см³ соответственно. Установлена корреляция между уровнем антител и устойчивостью животных к заражению. Проводились ли исследования эффективности иммунизации животных после

однократного введения антигена, его активности и сроков формирования иммунитета.

При оценке иммуностимулирующего действия адьювантов предпочтение отдано ГОА и сказано, что при его применении происходит концентрирование антигена. Однако в тексте отсутствует описание, как это происходит.

В настоящее время для изготовления вакцин широко используются масляные адьюванты, которые обладают более высоким иммуностимулирующим пролонгированным действием. Применение таких адьювантов возможно обеспечило бы более высокую эффективность вакцины против вируса ЛДР при введении меньшего объема при иммунизации животных. Почему не использовали более широко эту возможность?

Почему аттенуированный штамм вируса ЛДР не может быть использован для изготовления живой вакцины, какова его способность к реверсии инфекционных свойств? Почему отдано предпочтение этому штамму при изготовлении инактивированной вакцины по сравнению с вирулентными штаммами?

В качестве приложения №12 к диссертации представлен патент №2534343 «Способ получения моноклональных антител к белку Р30 вируса африканской чумы свиней с использованием рекомбинантных конструкций, что не совсем корректно. Следовало бы в тексте диссертации сделать только ссылку на использование методических подходов, изложенных в описании изобретения для решения поставленных задач.

В тексте имеются незначительные погрешности, требующие редакционных правок.

Сделанные замечания не снижают ценности выполнения работы.

Диссертация изложена на 306 листах, содержит разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения. Список использованной литературы включает 630 источников, в том числе зарубежных 536. Иллюстрирована 25 рисунками, 42 таблицами. В

приложении представлены копии титульных листов документов, отражающих итоговые результаты исследований.

По материалам диссертации опубликовано 50 печатных работ, в том числе – 13 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Автореферат отражает основные положения диссертационной работы, которая проведена по указанным проблемам в соответствии с пунктами 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 14 паспорта специальности 06.02.02. ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.


Заключение

По актуальности, методическому уровню, новизне и научно-практической значимости диссертация Капустиной О.В. на тему «Разработка и совершенствование средств и методов контроля особо опасных инфекций, вызванных вирусами порядка Mononegavirales» соответствует критериям «Положения о порядке присуждения ученой степени, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02. ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент,
доктор ветеринарных наук, профессор,
главный научный сотрудник,
ФГБУ «ВНИИЗЖ»


Диев
Вячеслав Иванович

Подпись доктора ветеринарных наук,
профессора В.И. Диева заверяю:
Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»
доктор ветеринарных наук, профессор


Русалеев
Владимир Сергеевич

