



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности»**
Диссертационный совет Д 006.069.01
141142, Московская обл., Щелковский р-н, пос. Биокомбината,
Тел/ Факс 8 (49656)7-32-63 e-mail: vnitibp@mail.ru

Утверждаю

Директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической промышленности»
академик РАН

А.Я. Самуilenко

«30» ноября 2016 года

ОТЗЫВ

Ведущей организации ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» на диссертацию Капустиной Ольги Владимировны «Разработка и совершенствование средств и методов контроля особо опасных инфекций, вызванных вирусами порядка Mononegavirales», представленной к защите на соискание учёной степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Актуальность избранной темы. Диссертация Капустиной О.В. посвящена разработке и практическому применению эффективных, высокотехнологичных, достоверных средств и методов контроля особо опасных болезней, вызванных вирусами порядка Mononegavirales. Лихорадка долины Рифт, высокопатогенный грипп птиц и болезнь Ньюкасла входят в список трансграничных особо опасных болезней.

Чтобы повысить эффективность диагностики и лечения в системе организации противоэпизоотических мероприятий необходимо расширить ассортимент высокоэффективных диагностикумов, лечебных препаратов и вакцин, пригодных к использованию в лабораторных и полевых условиях.

Поэтому становится совершенно очевидным, что ветеринарной практике необходимы меры системного подхода для противодействия угрозе возникновения особо опасных инфекций, применяя экспрессивные, современные методы ранней диагностики, профилактики и серологического мониторинга лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла; используя высокоспецифичные моноклональные антитела, ДНК-конструкции и рекомбинантные аналоги структурных белков вирусов.

Поэтому представляется целесообразным проведение диссертантом исследований по изучению рекомбинантных белков и плазмид, кодирующих гены иммунодоминантных белков вирусов лихорадки долины Рифт (ЛДР) и гриппа А; по определению кандидатного штамма вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР) для разработки инактивированной вакцины; по подбору лабораторной модели для контроля качества вирусного сырья; безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт; по отработке методов повышения антигенной и иммуногенной активности инактивированного антигена и ДНК-конструкций с целью индукции раннего иммунитета против гриппа птиц подтипа H5 и лихорадки долины Рифт, что позволит получить высокоактивные компоненты диагностических тест-систем, иммунизирующих профилактических биопрепаратов, представляющих важное звено в борьбе с инфекционными болезнями животных и птицы.

Содержание работы.

Представленная соискателем работа построена по традиционному плану, изложена на 306 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения. Список используемой литературы включает 630 источников, в том числе зарубежных авторов 536. Работа иллюстрирована 25 рисунками, 42 таблицами. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их

научную новизну и практическую значимость.

Во введении, диссертант обосновывает выбор темы и её актуальность, определяет цель и задачи работы, формулирует ее научную новизну и практическую значимость.

В разделе «Обзор литературы» дана характеристика особо опасным зооантропонозным болезням, вызываемых вирусами, представляющими порядок Mononegavirales, обобщены особенности репликации вирусов, их антигенные свойства, лабораторная диагностика, средства специфической профилактики, стратегия борьбы.

На основе данных литературы автор анализирует роль отдельных представителей семейств Orthomixoviridae, Paramixoviridae и Bunjaviridae порядка Mononegavirales в этиологии патологий животных и птицы.

Приведённый обзор отражает настоящее состояние вопроса, одновременно показывает, что диссертант анализирует материал литературы и обосновывает необходимость проведения настоящей работы.

В разделе «Материалы и методы» Капустина О.В. представляет вирусы и культуры клеток, с которыми она работала, приводит список реактивов и растворов, животных, лабораторного оборудования и методы работы.

В разделе «Собственные исследования» представлена схема технологии получения высокоспецифичных моноклональных антител, результаты использования реакции латексагглютинации при проведении скрининга клонов гибридом. Диссертантом представлены методы молекулярной диагностики лихорадки долины Рифт и гриппа птиц H5N1, подбор чувствительных культур клеток и оптимальных условий для репродукции вирусов в различных системах культивирования, методы получения качественного вирусного сырья с максимальным сохранением антигенной и иммуногенной активности, изучены антигенные свойств рекомбинантных плазмид и рекомбинантных белков.

Полученные высокоактивные препараты позволили использовать их в качестве компонентов при создании диагностических тест-систем на основе

ПЦР, ИФА и моноклональных антител.

В результате проведённых исследований Капустина О.В. предложила диагностическую тест-систему «Набор препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла «сэндвич»-вариантом ТФ ИФА», Стандарт организации - СТО (ТУ) 00495549-0011-2006 по изготовлению и контролю «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла» и Инструкцию по его применению, утвержденные 31.10.2006 г. заместителем руководителя Росветнадзора РФ. С 2006 г. «Набор препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла «сэндвич»-вариантом ТФ ИФА» был внедрён в ветеринарную практику РФ. Двухраундовая ОТ ПЦР с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов позволит проводить контроль генетической стабильности вакцинного штамма лихорадки долины Рифт, а также дифференцировать вакцинные и эпизоотические штаммы вируса.

В результате проведения производственных испытаний по оценке эффективности разработанных диагностических тест-систем было установлено, что они отвечает требованиям, предъявляемым к диагностическим препаратам, и могут быть рекомендованы для внедрения в ветеринарную практику.

В разделе «Обсуждение», соискатель обобщил результаты исследований по изучаемым вопросам и провел сравнительный анализ данных. Это позволило сделать заключение, что внедрение в практику разработанных диагностических тест-систем, вакцинных биопрепаратов, методов получения высокоактивных вирусных антигенов будет способствовать обеспечению эпизоотологического благополучия, улучшению качества ветеринарных препаратов.

В приложении представлены методические рекомендации, акты межлабораторных комиссионных испытаний, патенты, методические положения, СТО и инструкции.

Работа завершается 10 выводами, которые логически вытекают из результатов выполненной работы, и практическими предложениями.

Научная новизна.

Научная новизна работы состоит в создании эффективных средств и методов ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла; инновационных методических подходов при разработке стратегий прайм-бустерной иммунизации для профилактики ЛДР и гриппа птиц подтипа H5; схемы научно-обоснованных мер по обеспечению контроля ЛДР, позволяющих противодействовать появлению и распространению особо опасных инфекций на свободные территории РФ.

Впервые в РФ разработаны:

- способ получения моноклональных антител (МКА) направленной специфичности с использованием рекомбинантной плазмиды, несущей вставку гена гликопротеина G_n 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 G_n, синтезируемому *in vivo* и *in vitro*, выявлять в различных серологических реакциях, в том числе иммуноцитохимическим методом, антигенные детерминанты гликопротеина G_n вируса ЛДР;
- различные форматы ИФА, способные выявлять антигенные детерминанты нуклеопротеина вирусов ЛДР, гриппа птиц, болезни Ньюкасла; специфические антитела к данным вирусам. Использование рекомбинантного аналога NP вируса ЛДР обеспечивает повышение чувствительности и специфичности метода; позволяет дифференцировать в угрожаемой по ЛДР зоне инфицированных животных и привитых инактивированной или ДНК G_n/G_c вакцинами;

- методы ОТ-ПЦР, обеспечивающие надежное выявление в образцах инфицированного материала РНК вирусов гриппа птиц подтипа H5N1 и ЛДР, позволяющие дифференцировать их от других вирусов - представителей соответствующих семейств; ОТ-ПЦР с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов, позволяющие выявлять геном вируса ЛДР и дифференцировать вирулентные и аттенуированные вакцинные штаммы;
- дано научно-практическое обоснование использования аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» вируса ЛДР в перспективе разработки инактивированной вакцины, молекулярно-биологические свойства, которого обеспечивают экологическую безопасность, эффективность вакцины для применения в угрожаемой зоне;
- научно обоснованы и экспериментально подтверждены на лабораторной модели (аутбредные белые мыши): эффективность стратегий прайм-бустерной иммунизации против ЛДР и гриппа птиц подтипа H5 на основе использования рекомбинантных ДНК, кодирующих иммунодоминантные белки вирусов гриппа птиц (HA5 и NP) и ЛДР (Gn и Gc), ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР, которые обеспечивают развитие раннего специфического иммунитета у привитых животных; повышение иммунологической эффективности ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР. Разработана на примере ЛДР схема системных технологий, определяющая, на основе данных 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

Практическая значимость работы.

Результаты исследований Капустиной О.В. представляют теоретическую и практическую ценность по использованию тест-систем для диагностики и для

оптимизации противоэпизоотических мероприятий против ряда опасных инфекционных болезней.

Результаты исследований Капустиной О.В. использованы при составлении методических рекомендаций, научно-нормативных документов, утверждённых в установленном порядке.

Экспериментально подтверждены теоретические основы получения высокоактивных специфичных МКА к Gn/Gc вируса ЛДР с использованием генноинженерных конструкций и рекомбинантных белков, позволяющие значительно сократить сроки получения специфических моновалентных и моноклональных антител; повысить выход специфических клонов гибридом, продуцирующих МКА, специфичные к конформационным эпитопам антигена.

Разработаны различные форматы ОТ ПЦР (ЛДР, грипп птиц H5N1) и 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; от других вирусов, представителей соответствующих семейств.

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

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

Подтверждена экспериментально 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; повышению иммунологической эффективности инактивированного антигена вируса ЛДР.

Предложена стратегия гетерогенной прайм-бустерной иммунизации, которая может быть использована для получения моноспецифических и моноклональных антител к отдельным белкам или их фрагментам, для вакцинации восприимчивых животных против ЛДР в угрожаемой зоне; обеспечивает эффективность стратегии дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (DIVA) с применением ТФ ИФА на основе рекомбинантного нуклеопротеина и соответствующих МКА.

Предложена схема системных технологических решений, использование которой позволит в короткие сроки получить биологически активные препараты на основе применения рекомбинантных плазмид и белков; что обеспечит создание и производство средств ранней диагностики и профилактики ЛДР в случае угрозы возникновения болезни. 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.

Апробация результатов исследования и публикации работ.

Основные положения диссертационной работы 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: Международной Российско-Американской научно-практической конференции г. Москва «Болезни диких животных» 2007 г.; Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2012 г.), «Актуальные вопросы ветеринарной медицины Сибири», Улан-Уде, 2013 г.; на конференции «Биоиндустрия 2013» в

рамках Петербургского международного форума «Здоровье», г. Санкт - Петербург, 2013 г. Практические аспекты применения научных разработок были представлены за период 2002 -2014 гг. на семинарах в «Учебном центре по подготовке, переподготовке и повышению квалификации специалистов ветеринарных лабораторий субъектов Российской Федерации» ФБГУ ЦНМВЛ (г. Москва).

По материалам диссертации опубликовано 50 печатных работ, из них 13 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских диссертаций. Приоритетность результатов исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретение.

Замечания по работе.

1. Нет заключения по обзору литературы, где автор обобщил бы свои мысли, полученные при анализе многочисленных источников.
2. В работе встречаются опечатки, предлог сливается со следующим словом в одно или слово сливается с другим словом, есть неудачные выражения. Диссертант выражает свои мысли громоздкими предложениями, в которых теряется полученный автором важный результат исследования. Нечётко, неёмко сформирована новизна исследований, где содержатся ещё и неудачные громоздкие выражения мысли автора. Например, в разделе, отражающем новизну, автор пишет: « ...обеспечивают развитие раннего специфического иммунитета у привитых животных, в том числе протективного; повышение иммунологической эффективности ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР....».

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Разработанные автором методы ТФ ИФА для выявления антигенов вирусов и специфических антител к ним в совокупности с методами генодиагностики могут быть использованы для ранней диагностики и

мониторинговых исследований для предотвращения распространения болезней, вызванных вирусами порядка Mononegavirales.

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.

Применение «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла» позволяет идентифицировать антигены вируса и одновременно дифференцировать грипп птиц и б. Ньюкасла. ГОА-сорбированный инактивированный антиген вируса ЛДР из аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» и стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации рекДНК Gn/Gc ГОА-сорбированным инактивированным антигеном вируса могут быть использованы для профилактики заражения и распространения ЛДР в угрожаемых зонах.

Предложенный диссертантом алгоритм предотвращения заноса вируса и борьбы с ЛДР позволит эффективно осуществлять раннюю диагностику, профилактику на основе применения ДНК-конструкций, рекомбинантных белков и инактивированного антигена вируса, что обеспечит эпизоотическое благополучие РФ.

Заключение.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет. На основании анализа материалов диссертации можно сделать вывод, что работа выполнена на современном методическом уровне, содержание автореферата отражает материалы, изложенные в диссертации.

Диссертация Капустиной О.В. является научной квалификационной работой, в которой содержится решение проблемы ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла; создания средств и стратегий специфической профилактики особо опасных инфекций (на примере ЛДР и гриппа птиц H5) на основе достижений молекулярной

биологии.

Работа по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объёму экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов, полностью соответствует критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученой степени», утверждённого Постановлением №842 Правительства РФ от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор Капустина Ольга Владимировна заслуживает присуждения искомой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Диссертация и отзыв на диссертацию обсуждены, одобрены на научно-производственном совещании сотрудников отдела молекулярной биологии и вирусологии ФГБНУ ВНИТИБП (протокол №4 от 25 ноября 2016 г.).

28.11.2016 г.

Заведующая отделом
молекулярной биологии и вирусологии,
доктор биологических наук,
профессор, Лауреат Премии
Правительства РФ
в области науки и техники



Матвеева Ирина Николаевна

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», (ФГБНУ «ВНИТИБП»),

141142, Московская обл., Щелковский р.-н, пос. Биокомбината, дом 17,

e-mail: vnitibp@mail.ru , тел.(496) 56-7-32-63, (495)526-43-74

Подпись Матвеевой И.Н. удостоверяю:

Учёный секретарь

ФГБНУ «ВНИТИБП»



Фролов Юрий Дмитриевич