

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Карповой Марианны Алексеевны «Разработка тест-системы для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) иммуноферментным методом» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология; 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Актуальность темы диссертационной работы. В 2016 году доля аграрного сектора России в структуре ВВП страны выросла до 3,9 %. Этот показатель является самым высоким после кризиса 2008–2009 годов. Одной из важнейших отраслей сельского хозяйства является аквакультура. В общемировом объёме пищевой рыбы на ее долю приходится почти половина. Важнейшими государственными документами, которыми руководствуются рыбоводы страны, являются Продовольственная доктрина РФ, Государственная программа развития сельского хозяйства и Стратегия развития аквакультуры в РФ на период до 2020 года. Необходимо развивать независимое производство сельскохозяйственной продукции, включая производства аквакультуры.

В процессе культивирования гидробионтов особенно актуальна борьба с инфекционными заболеваниями. Одно из опаснейших заболеваний — инфекционный некроз поджелудочной железы лососёвых (Infectious pancreatic necrosis, IPN) — высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая молодь культивируемых лососевых и некоторых других семейств, обитающих как в пресной, так и в морской воде, вызывающая до 90% гибели поголовья в условиях индустриального рыбоводства. По своим последствиям IPN расценен как самое серьезное заболевание в производстве лососевых.

Традиционными диагностическими методами на IPN во всем мире являются выделение вируса в культуре клеток с последующей идентификацией в реакции нейтрализации. Дополнительно в диагностических лабораториях вирус, выявляют иммуногистохимически в гистологических препаратах, в реакции гемагглютинации или молекулярными методами, такими как ПЦР.

Вход. № 34
«15» мая 2018 г.
подпись 

В свете изложенных проблем актуальность темы диссертационной работы М.А. Карповой, посвященной разработке тест-системы для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых не вызывает сомнения.

Степень обоснованности положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Представленная на отзыв работа выполнена на хорошем организационно-методическом уровне. Дизайн исследования в целом и основные методологические подходы следует признать современными и адекватными поставленным задачам. Сформулированные автором выводы базируются на результатах собственных исследований, подвергнутых рациональной математической обработке, и отражают достижение цели диссертационной работы. Не вызывает принципиальных возражений и формулировка новизны исследования, теоретической и практической значимости работы. Научная интерпретация полученных данных проведена в свете современных парадигм вирусологии. Основные научные положения диссертации подверглись экспертизе при опубликовании статей в рецензируемых научных изданиях и были предметом обсуждения на научно-практических конференциях.

Достоверность и новизна научных положений и выводов.

Достоверность полученных результатов, научных положений и выводов, представленных в диссертации М.А. Карповой, определяется тщательно проведенным анализом разработанности темы, большим объемом материалов исследования, использованием сертифицированного оборудования, апробированных, надежных методов исследований, обеспечивших современный научно-методический уровень.

В работе представлен целый ряд положений и результатов, обладающих несомненной новизной. Основным является научное положение об успешной разработке иммуноферментной тест-системы для обнаружения антигенов вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых.

Была разработана научная платформа, позволившая решить технологические и производственные проблемы по созданию ИФА диагностикумов.

Получена постоянная линия клеток из гонад радужной форели чувствительна к шести вирусам трех таксономических групп: Birnaviridae, Rhabdoviridae, Herpesviridae. Отработана эффективная схема накопления, очистки и концентрирования вируса IPN, а

так же схема иммунизации кроликов для получения высоко активной специфической сыворотки к вирусу IPN.

Инновационный характер разработки, представленный в диссертации, позволил реализовать задачу по импортозамещению диагностических препаратов.

Однако есть пара замечаний, касающихся выводов. Вывод №5 «...оптимальное соотношение иммуноглобулинов к пероксидазе хрена составило 1:2». Это соотношение, которое является стандартным при приготовлении пероксидазных конъюгатов с иммуноглобулинами класса G уже много лет! Вывод №6 «Оптимальными условиями адсорбции антител против вируса IPN на полистироловых планшетах является их концентрация 20 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере, инкубация 2 часа при 37 °С и далее 18 часов при 4 °С. При этом рабочее разведение конъюгата составило 1:16000, а использование в качестве субстрата тетраметилбензидина повысило чувствительность реакции в отличие от ортофенилендиамина» - уже не новость лет 20! Такой вывод можно было бы написать, если антитела были получены от какого-то экзотического животного, например рыбы.

Оценка практической значимости работы.

Практическая значимость диссертационной работы более чем очевидна. Автором разработана ИФА тест-система для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых. Разработаны и утверждены: «Наставления по применению набора для диагностики инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPN)».

Использование ИФА тест-системы для анализа эпизоотической ситуации в отношении возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, позволило из 37 обследованных хозяйств выявить 5 неблагополучных.

Содержание диссертационной работы.

Диссертация написана по классическому типу, изложена на 118 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы исследования и результаты), заключение, выводы, список литературы, содержащего 180 источников, иллюстрирована 6 таблицами 6 рисунками.

В обзоре литературы в 12-ти разделах отражены практически все данные о вирусе некроза поджелудочной железы лососевых. Содержание обзора литературы определяется направленностью диссертационных исследований, полностью отвечает своему назначению, а так же хорошо коррелирует с целями и задачами диссертационной работы. В обзоре проведен детальный анализ 118 литературных источников, что свидетельствует о профессиональной эрудиции автора.

Исходя из содержания раздела 2.11. обзора литературы, под названием «Иммунизация», по моему мнению, больше подошло бы название «Вакцинопрофилактика».

Глава 3 «Собственные исследования» содержит подробные сведения о материалах и методах исследований, способах статистической обработки данных, свидетельствующие о многосторонней квалификации автора и высоком методическом уровне выполненной работы. В процессе проведения исследований были использованы методы культивирования клеток, концентрации и очистки вируса, реакция нейтрализации и иммуноферментный анализ (ИФА). Значимая часть работы выполнена на лабораторных животных.

В подразделе 3.2. представлены данные о чувствительность разных культур клеток рыб к вирусу IPN, данные о биологических свойствах нескольких штаммов вируса IPN. В результате экспериментов по изучению влияния pH было установлено, что вирус IPN сохраняет жизнеспособность через 7 дней хранения при всех испытанных pH, только при pH 1,0 – титр вируса составил 1,0 lg, однако, при последовательном заражении увеличился до 4,0 lg и 7,0 lg во втором пассаже и третьем пассаже соответственно. Полностью вирус инактивируется через 14 дней хранения при pH 1,0, что подтверждено результатами исследования в ПЦР. Во всех остальных образцах, включая контроль, за 45 дней хранения, титр вируса снизился не более чем на 0,5 – 1,2 lg.

Подраздел 3.3. посвящен получению постоянной линии клеток «OMG» из ткани гонад половозрелой радужной форели путем длительного пассирования. В результате опытов установлено, что клеточная линия OMG особенно чувствительна к бирнавирусам лососевых.

Раздел по очистке и концентрированию вируса содержит полную информацию о ходе работы, а так же результаты экспериментов по оценке получаемых продуктов.

Окончательный результат очистки и концентрирования вируса составил значительные 12 lg при титровании вируса! Но титр вируса ничего не говорит о его количестве (титр вируса в 1 мл жидкости и в 1 л — разное количество вируса). Поэтому, хотелось бы увидеть это значение в дозах вируса или микрограммах. Тем более что в следующем подразделе так и сделано.

Впечатляющий раздел «Иммунизация кроликов», содержащий множество вариантов (схем) иммунизации для получения антисыворотки к вирусу IPN и результаты экспериментов, обосновывает схему иммунизации в течение 28 дней с постепенным нарастанием дозы антигена по белку от 1 см³ до 2 см³ и снижением количества инъекций до 5. Это позволило получить специфичные антисыворотки к вирусу IPN с высоким титром антител (1:2048) в реакции нейтрализации в отличие от других испытанных схем.

Подразделы 3.6 и 3.7 посвящены выделению специфических глобулинов против вируса IPN и приготовлению пероксидазного конъюгата специфических антител с пероксидазой хрена. Разделы содержат подробнейшие инструкции по приготовлению компонентов. Хотя, на мой взгляд, это должно описываться в «Материалах и методах». Либо нужно указывать, чем данный метод отличается от общеизвестного. В описываемых подразделах отсутствуют результаты, получаемые в ходе работы и характеризующие конечные продукты. Например, указывается, что «Для поиска оптимального соотношения иммуноглобулинов к пероксидазе хрена конъюгирование проводилось в трех вариантах иммуноглобулины к ПХ 1:1, 1:2 и 2:1...», но результатов сравнения не представлено! А о том, что выделение иммуноглобулина было успешным, можно только догадаться по фразе в самом конце подразделов - «Рабочее разведение конъюгата составило 1:16000».

Здесь же хочется задать вопрос: почему для выделения иммуноглобулинов не использовалась хорошо себя зарекомендовавшая афинная хроматография, например, с протеин-А сефарозой?

Подраздел 3.8 «Определение оптимальных условий постановки «сэндвич» ИФА» страдает теми же недостатками, что и два предыдущих. Написано, что изучались разные концентрации иммуноглобулинов при сорбции планшетов — результаты не представлены. Сравнивали два вида хромогена — результаты не представлены. Испытывали несколько блокирующих растворов — результаты не представлены.

В завершение обсуждаемого раздела вопрос: почему использовался ОФД, пусть даже для сравнения, если весь мир давно от него отказался?

Очень сильный раздел «Определение позитивно-негативного порога (ПНП)». В нем аргументированно показано, как были определены критерии интерпретации результатов, полученных при использовании созданной тест-системы. Единственным, что для меня остается загадкой, это отношение S/P. Не удалось найти расшифровку ни в тексте раздела, ни в списке сокращений.

В подразделе 3.10. «Определение специфичности и чувствительности тест-системы для выявления вируса IPN» представлены результаты по сравнительному использованию приготовленного набора. Оценку чувствительности и специфичности тест-системы проводили путем сравнительного анализа результатов обнаружения антигенов IPN и РНК вируса соответственно методами ИФА, реакции нейтрализации (РН) и ПЦР. Минимальная концентрация антигена, соответствующая наименьшему положительному результату определения, составила $10^{2,5}$ ТЦД₅₀/см³.

При сравнительном исследовании материала тремя методами на наличие вируса IPN показано, что результат ИФА полностью совпадает с результатами РН и ПЦР. Это свидетельствует о высокой специфичности и чувствительности созданной тест-системы.

В ходе определения стабильности специфических компонентов набора при хранении (подраздел 3.11) было установлено, что исходная активность специфических компонентов, сохранялась в течение одного года хранения при температуре 4–8°C (например, рабочее разведение специфического конъюгата сохранялось на уровне 1:16000). Однако в главе 4 «Обсуждение результатов» указывается, что рабочее разведение конъюгата после годового хранения составило 1:20000 (очевидно, это опечатка).

Апробацию разработанной тест-системы (подраздел 3.12. «Испытание полученной тест-системы в производственных условиях») провели на шести тысячах двести сорока шести экземплярах лососевых рыб из тридцати семи хозяйств Московской, Ленинградской, Калужской, Мурманской, Владимирской, Смоленской, Новгородской, Тверской областей, Республик Алания и Карелия. В ходе «полевых испытаний» ИФА тест-системы для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых было выявлено пять случаев заражения рыб в хозяйствах Республики Карелия и Мурманской области. Результаты исследований

были подтверждены несколькими лабораторными методами, в частности выделением вируса в культуре клеток, РН, ПЦР и электронной микроскопией.

Разделы «Обсуждение результатов исследования» и «Заключение» в целом построены логично и убедительно.

Выводы отражают четко сформулированные решения поставленных задач. Как мне кажется, выводы №6 и №7 можно было бы заменить на один, в котором утверждалось бы, что впервые в России создана и охарактеризована ИФА тест-система... В выводе №7 указано: «...минимальное значение оптической плотности, при котором результат был положительным, составило 0,545...» А ведь это число будет другим при изменении серии любого из специфических компонентов тест-системы.

Работа написана грамотным научным и литературным языком. Очень малое количество стилистических ошибок сконцентрировано в Обзоре литературы и объясняется, очевидно, «трудностями перевода». Не могу не обратить внимание на ошибку, допущенную в стандартной (официальной) части диссертации (пункт 1.4 Научная новизна). Речь идет о получении антивирусных, а не антивидовых сывороток. Так же хотелось бы попросить заменить в будущем слово шуттелирование на подходящее из русского языка.

Теоретическая и практическая ценность представленной на отзыв диссертации не вызывает сомнений.

Материалы диссертации достаточно полно изложены в 4 статьях в отечественных рецензируемых журналах, входящих в Перечень, рекомендованный ВАК, а так же в Патенте РФ №2495120.

Автореферат отражает содержание диссертации.

Оценивая положительно представленную диссертацию, было бы целесообразно в процессе официальной защиты выяснить у автора перспективы регистрации и внедрения набора ИФА в вет. практику в Российской Федерации и, возможно, за рубежом.

Заключение.

Диссертационная работа Марианны Алексеевны Карповой «Разработка тест-системы для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) иммуноферментным методом» является самостоятельным

законченным научным трудом на актуальную тему, направленным на изучение влияния инфекционных заболеваний на аквакультуру и развитие методов лабораторной диагностики этих инфекций. Научно обоснованы и реализованы все этапы исследований. В работе решены научные фундаментальные и прикладные задачи, имеющие важное народнохозяйственное значение. Достоверность данных обеспечивается представительностью выборки образцов, достаточным числом проведенных исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к оценке результатов, выполненным с использованием современных методов.

Таким образом, диссертационная работа М.А. Карповой «Разработка тест-системы для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) иммуноферментным методом» полностью соответствует критериям пункта 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям: 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология; 03.01.06 – биотехнология.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук



Ларичев В.Ф.

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18, тел. 8(499)193-30-01, info@gamaleya.org.

Подпись Ларичева Виктора Филипповича заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

к.б.н. Л.К. Кожевникова

15.05.2018

