

ОТЗЫВ

официального оппонента, член-корреспондента РАН, профессора,
доктора биологических наук
Девришова Давудай Абдулсемедовича

на диссертацию Капустина Андрея Владимировича «Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец», представленную к защите в диссертационный Совет Д 006.033.02 на базе ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН им. К.И. Скрыбина и Я.Р. Коваленко на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Актуальность темы диссертационной работы

Клостридиозы представляют собой важную проблему ветеринарной медицины, о чем свидетельствуют материалы ВОЗ, сообщения исследователей и практических специалистов. Анаэробные инфекции протекают с явлениями тяжёлой интоксикации и почти всегда заканчиваются летально. Специфическая профилактика остается единственным надежным способом предупреждения анаэробных инфекций.

Поскольку клостридиозы вызываются, как правило, ассоциацией возбудителей, целесообразно использовать ассоциированные вакцины, включающие в себя широкий спектр возбудителей, клинически значимых для крупного и мелкого рогатого скота.

Основной целью научных исследований Капустина А.В. являлось решение проблемы специфической профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец, для чего требовалось разработать современную эффективную поливалентную вакцину, включающую антигены наиболее клинически значимых видов возбудителей анаэробных болезней.

Для достижения поставленной цели поставлены следующие задачи: изучить современную этиологическую структуру клостридиозов в РФ; селекционировать производственные штаммы возбудителей клостридиозов животных и изучить их биологические свойства; разработать современную технологию изготовления анатоксинов, сконструировать экспериментальные

образцы вакцины, провести доклинические и клинические испытания препарата; разработать методы контроля иммуногенной активности каждого компонента вакцины против клостридиозов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Уровень обоснованности научных положений следует из результатов анализа литературных данных и собственных исследований. Представленные научные положения обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Результаты научных исследований согласуются с теоретическими и литературными данными и положениями, принятыми в микробиологии.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые разработана, зарегистрирована и внедрена в практику вакцина против клостридиозов КРС и овец. Препарат позволяет одновременно профилактировать восемь наиболее значимых анаэробных инфекций, вызываемых *C. chauvoei*, *C. perfringens* типов А, С, D, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. tetani*. Для изготовления вакцины разработана и внедрена технология, основанная на современных методах культивирования, инактивации, концентрирования анатоксинов клостридий мембранными методами.

Определены основные параметры поливалентной вакцины: оптимальное соотношение компонентов, отсутствие интерференции, сроки наступления и продолжительность иммунитета, безопасность для животных различных видов, иммуногенная активность, специфическая эффективность.

Разработан количественный метод контроля препарата, позволяющий оценить напряженность иммунитета к клостридиозам, а также методические рекомендации по диагностике клостридиозов животных.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что разработана, зарегистрирована и внедрена в производство

инактивированная поливалентная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота «Клостбовак-8», серийный выпуск которой осуществляет ООО «Ветбиохим».

Разработана и внедрена в практику современная технология изготовления токсоидов клостридий методом мембранной фильтрации. Разработан количественный способ контроля препарата, позволяющий оценить напряженность иммунитета у вакцинированных животных, заложенный в СТО организации. На основе материалов диссертации разработаны методические указания «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», утвержденные РАН РФ в 2017 г.

Оценка содержания диссертации, ее завершённость и качество оформления.

Диссертация построена по традиционному типу, изложена на 288 страницах, содержит 35 таблиц, 22 рисунка, 20 приложений, состоит из девяти разделов, включающих введение, обзор литературы, материалов и методов исследований, полученных результатов, обсуждения, выводов, практических предложений. Список использованной литературы содержит 279 источников, в том числе 136 зарубежных. Оформление диссертации соответствует требованиям ВАК, работа написана грамотным научным языком, имеет четкую структурную и логическую последовательность в изложении материала.

В диссертации представлено развернутое обоснование актуальности темы, выбрана цель и конкретизированы задачи научного исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, а также данные о научной новизне и практической значимости работы.

Реализация и апробация результатов и выводов диссертации

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 Ученых советов ФГБУ «ВГНКИ» и ФНЦ ВИЭВ РАН, шести научных конференциях и ветеринарном конгрессе.

В период выполнения диссертационной работы опубликовано 32 научные статьи, из них 25 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, и патент РФ на изобретение.

В обзоре литературы диссертант осветил вопросы таксономии и классификации бактерий семейства Clostridiaceae (п. 2.).

- п. 2.1. автор представил данные о распространенности наиболее клинически значимых для жвачных животных видов клостридий.

- п. 2.2. отражены биологические характеристики возбудителей клостридиозов и вызываемых ими болезней, таких как *Cl. perfringens* типов А, В, С, D; *Cl. chauvoei*; *Cl. tetani*; *Cl. septicum*; *Cl. oedematiens*; подробно описаны их культуральные, морфологические, тинкториальные, ферментативные, патогенные и токсигенные свойства.

- п. 2.3. приведена методика диагностирования клостридиозов животных с учетом эпизоотических данных, клинических признаков, характерных патологоанатомических изменений. Автор акцентирует внимание на то, что для постановки окончательного диагноза на клостридиоз важную роль имеет бактериологическое исследование материала. Также представлен протокол проведения лабораторно-диагностических исследования, позволяющих поставить окончательный диагноз на клостридиоз.

- п. 2.4. диссертантом изложены принципы специфической профилактики клостридиозов животных, представлен анализ существующих биопрепаратов, приведены их характеристики.

- п. 2.5. приведены особенности технологии культивирования клостридий для производства иммунобиологических средств. Диссертантом отражены последовательные этапы производства вакцин содержащих клостридиозные компоненты.

- п. 2.6. работы посвящен методам контроля иммунобиологических препаратов в РФ, позволяющие оценить эффективность клостридиозных вакцин и анатоксинов.

- п. 2.7. - обсуждение обзора литературы, обосновывающее и подтверждающее необходимость проведения настоящей работы.

В собственных исследованиях представлены материалы и подробно описаны методы исследования, которые диссертант использовал при проведении экспериментов по теме диссертации.

В результатах собственных исследований расписан ход экспериментов, на основе которых построена диссертация.

- п. 4.1. «Этиологическая структура клостридиозов в РФ» автор представляет современные данные по основным видам клостридий, циркулирующих в сельхозпредприятиях России. Для получения результатов диссертантом использованы аналитические отчеты ветеринарных лабораторий и ФГБУ «Центр ветеринарии», а также результаты собственных диагностических исследований, которые отражены в пункте 4.2. «Эпизоотическое обследование хозяйств неблагополучных по клостридиозам». Автором отмечается снижение выявленных неблагополучных пунктов по всем клостридиозным заболеваниям коров и овец в период с 2007 по 2017 г., что говорит о стабилизации эпизоотической ситуации, которая может наблюдаться лишь при проведении своевременных профилактических мероприятий, наиболее эффективным из которых является вакцинация. Также автор отмечает, что официальные данные не всегда отражают реальную ситуацию с заболеваемостью животных анаэробными инфекциями, так как часто владельцы предпочитают не обращаться в Государственную ветеринарную службу, опасаясь наложения ограничительных мероприятий и экономических потерь.

В ходе данной работы диссертантом обследовано 32 предприятия в 16 областях России, исследовано 2913 проб материала от 983 коров и 119 телят.

Для наглядности в разделе приведены рисунки, позволяющие оценить разнообразие клинико-морфологических форм проявления клостридиозов.

-п. 4.3. «Бактериологические исследования», представлена последовательность проведения диагностики рутинными методами. С ходе реализации данного этапа автор установил, что наиболее клинически значимыми являются виды *C. septicum* – обнаруживается в 34,5 % случаев, *C. perfringens* тип А - 23,25%, *C. perfringens* тип С – 14,25 %, *C. perfringens* тип D – 6,5 %, *C. oedematiens* – 2,5 %, *C. sordellii* – 6,5%. Остальные виды (*C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. hastiforme*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. sporogenes*, *C. tertium*) занимают лишь 1-2 %.

Проведенное бактериологическое исследование позволило отобрать 25 высоковирулентных и токсигенных штаммов клостридий, среди которых *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. Sordellii* и др.

- п. 4.4. «Совершенствование технологии изготовления вакцины» посвящен результатам разработки различных методов промышленного культивирования штаммов, при этом особое внимание уделено таким этапам как: изготовление MSB производственных штаммов клостридий, обладающих высокой скоростью роста и интенсивным токсинообразованием; замена питательных сред; изменение параметров культивирования; отработка методики детоксикации; концентрирование и очистка токсинов и анатоксинов мембранными методами.

Обозначенные задачи являются актуальными в отношении выполнения GMP требований при организации современных производств и в полной мере отражены в ходе выполнения настоящей работы, в пунктах:

- п.4.4.1. «Подбор штаммов клостридий», где автор отражает требования к контрольно-производственным штаммам.

- п. 4.4.2. «Характеристика MSB производственных штаммов клостридий», описывающий свойства используемых штаммов.

- п. 4.4.3. «Подбор питательной среды, обеспечивающей высокое стабильное накопление токсинов», данная задача выполнялась с целью

достижения максимального количества токсина в высоком титре. Для достижения нужного эффекта автор указывает о необходимости учитывать не только химический состав питательной среды, но и ростовые индивидуальные потребности каждого штамма.

- п. 4.4.4. и 4.4.5. «Совершенствование технологии культивирования клостридий», диссертантом акцентируется внимание на том, что при переходе с лабораторного на промышленное культивирование, значительно изменяются требования и параметры роста, что необходимо учитывать при производстве анатоксинов.

- п. 4.4.6. «Инактивация культур и токсинов клостридий» - диссертант обосновывает, что существующая схема инактивации высокими дозами формалина сказывается на иммуногенности вакцин, поскольку ведет к значительной потере антигенности. С целью максимального сохранения количества и качества полученных токсинов, автором отработана технология ступенчатой инактивации антигенов с уменьшением количества формалина.

- п. 4.4.7. «Определение эффективной дозы каждого компонента» - установлена эффективная доза каждого антигена, что позволяет при компоновке серии препарата обеспечить оптимальное соотношение компонентов, обладающих высокой протективной активностью и не влияющих отрицательно друг на друга.

- п. 4.4.8. и 4.4.9. «Составление серии вакцины» отражен антигенный состав и характеристика разрабатываемый автором вакцины против клостридиозов.

Оценка препарата по безопасности применения отражена в пункте 4.4.10. Исследования проводились на значительном поголовье КРС различных возрастных групп, а также беременных животных, и овец (п. 4.4.11.) в различных животноводческих предприятиях России, согласно требованиям ФЗ-61. У всех подопытных животных отсутствовали какие-либо нежелательные системные и местные реакции на введение препарата, либо были незначительными.

- п. 4.5. посвящен разработке методов контроля иммуногенной и антигенной активности вакцины. Для вновь созданной вакцины требовались усовершенствованные методы контроля иммуногенной и антигенной активности, для чего было необходимо установить наиболее подходящую для этого модель лабораторных животных, подобрать оптимальную дозу препарата, вызывающую достаточный уровень иммунитета у лабораторных животных, установить защитный титр антител в крови вакцинированных животных. Для выполнения этого этапа работы, диссертантом изготовлены заражающие культуры и токсины клостридий, аттестованные в сравнении с международными и национальными стандартами (п. 4.5.1.).

- п. 4.6. посвящен изучению интерференции компонентов в вакцине «Клостбовак-8». Проведенные опыты подтвердили высокую иммуногенную активность комплексного препарата. Как видно из представленных в данных, между компонентами вакцины практически отсутствует отрицательное взаимное влияние, что проявляется выживаемостью 90-100 % использованных в опытах иммунизированных лабораторных животных, как в группах, вакцинированных моновакцинами, так и в группах, вакцинированных поливалентной вакциной «Клостбовак-8».

Изучение стабильности препарата в процессе хранения и обоснование срока годности отражено в пункте 4.7. (у автора в тексте работы ошибочно указан п. 4.6.), в ходе чего установлено, что при хранении в условиях холодильника при температуре 2-8 °С и влажности около 50% иммуногенные свойства вакцины остаются стабильными на протяжении 24 мес наблюдения. Обоснован срок хранения препарата - 18 мес.

При определении длительности иммунитета (п. 4.8. и 4.9.) на лабораторных и восприимчивых животных автор установил, что при применении препарата в соответствии с инструкцией, поливалентная вакцина обеспечивает невосприимчивость вакцинированных животных на срок 12 мес, после чего проводят ревакцинацию поголовья.

- п. 4.10. «Специфическая эффективность вакцины на восприимчивых животных» отражает результаты оценки эффективности применения вакцины «Клостбовак-8» в неблагополучных по клостридиозам хозяйствах Московской обл, Республики Мордовия, Ставропольского и Краснодарского краев. В опытах использовано 874 голов крупного и 1234 голов мелкого рогатого скота. Результаты клинических испытаний при анаэробной энтеротоксемии (п. 4.10.1.), при злокачественном отеке коров (п. 4.10.2.), при эмфизематозном карбункуле (п. 4.10.3.), при столбняке (п. 4.10.4.), клостридиозах овец (п. 4.11.). подтверждают безвредность и эффективность вакцины «Клостбовак-8» для профилактики клостридиозов в неблагополучных скотоводческих и овцеводческих хозяйствах, что позволяет рекомендовать её для профилактики анаэробных инфекций у животных, в том числе стельных коров, суягных овцематок, молодняка.

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

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

В автореферате и опубликованных автором статьях отражено основное содержание работы.

Практические предложения.

Разработана, зарегистрирована и внедрена в практику вакцина поливалентная против клостридиозов овец и крупного рогатого скота инактивированная «Клостбовак-8».

Разработана технология изготовления анатоксинов клостридий методом мембранной фильтрации.

Разработан способ контроля иммуногенной активности вакцины, позволяющий количественно оценить напряженность антитоксического иммунитета у вакцинированных животных. Метод включен в нормативно-техническую документацию на методы контроля вакцины «Клостбовак-8» и

на методы изготовления и контроля качества производственных штаммов клостридий: СТО на штаммы *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. tetani*, *C. chauvoei*.

Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на методы изготовления и контроля качества производственных штаммов клостридий: СТО на штаммы *C. perfringens* типов А, С и D, *C. septicum*, *C. oedematiens* тип В, *C. tetani*, *C. chauvoei*.

Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на методы изготовления и контроля качества вакцины поливалентной «Клостбовак-8»: инструкция по применению, СТО организации, ТР.

Результаты исследований легли в основу разработанных методических указаний «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», включающих современные методы диагностики болезней и идентификации возбудителей клостридиозов этиологически значимых видов возбудителей.

Замечания по диссертационной работе

1. На стр. 104 указано, что несмотря проводимую вакцинацию против эмфизематозного карбункула всего поголовья крупного рогатого скота в возрасте от 3 мес до 4 лет, ежегодно регистрируются новые случаи заболевания. Какие причины, по мнению автора, этому способствуют, и не является ли это следствием применения вакцин ненадлежащего качества?

2. Одним из наиболее актуальных заболеваний в овцеводстве является анаэробная дизентерия, вызываемая *C. perfringens* тип В. Однако данный серотип не включен автором в состав созданной вакцины.

3. Разработанная вакцина предназначена для крупного рогатого скота и овец. Но к мелкому рогатому скоту так же относятся козы, которые также подвержены различным анаэробным инфекциям. Хотелось бы получить разъяснения, почему такая работа не проводилась и можно ли использовать вакцину для них?

4. В тексте встречаются стилистические и орфографические ошибки, опечатки и неудачные выражения.

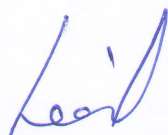
Перечисленные замечания и пожелания не имеют принципиального значения, не влияют на научное и практическое значение выполненной работы и не снижают её положительной оценки.

Заключение.

Диссертационная работа Капустина Андрея Владимировича «Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец» является самостоятельной, завершённой научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная и экономически значимая научная проблема. Диссертационная работа по актуальности, новизне, практической значимости, объёму выполненных исследований и степени внедрения в научно-исследовательскую практику, соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции от 28.08.2017), а ее автор, Капустин Андрей Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук,
профессор, заведующий
кафедрой иммунологии и
биотехнологии



Девришов

Давудай Абдулсемедович

11 сентября 2019 г

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23. Телефон: 8(495) 377-69-87 (83), e-mail: davud@agrovvet.ru

Подпись Девришова Давудай Абдулсемедовича заверяю

делопроизводитель

11

