



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)**

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11

тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП – 166001001

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Капустина Андрея Владимировича на тему: «Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец», представленную в диссертационный совет Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» 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.

Патогенные виды микроорганизмов рода *Clostridium* вызывают тяжелые заболевания, которые по родовому наименованию возбудителя объединены под термином клостридиозы и, большинство из них, по основному патогенетическому признаку, отнесены к группе токсикоинфекций. Клостридиозы причиняют значительный экономический ущерб животноводству. Вопрос о формах постановки и выполнения задачи ликвидации клостридиозов сельскохозяйственных животных в настоящее время не получил исчерпывающего разрешения. Это обусловлено главным образом тем, что еще не выяснены многие принципиальные вопросы эпизоотологии, иммунологии, специфической профилактики данных болезней. В свете вышеизложенного, диссертационная работа Капустина А.В., посвященная изучению этиологической структуры и специфической профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец, является актуальной для ветеринарной науки и практики. Для достижения поставленной цели диссертантом были поставлены и решены соответствующие задачи:

- изучить этиологическую структуру клостридиозов крупного рогатого скота в РФ;
- провести подбор штаммов клинически значимых возбудителей клостридиозов животных, изучить в сравнительном аспекте их антигенные и токсигенные свойства;

Вх. № 84

10 сентября 2009 г.

участник секции
ФГБНУ ФНЦ В ИЗБ РАН

И. Г. Мадв

- разработать современную технологию изготовления препарата (питательные среды, режимы культивирования, инаktivация, концентрация антигенов);
- определить эффективную иммунизирующую дозу каждого монопрепарата и сконструировать экспериментальный образец вакцины;
- провести доклинические и клинические исследования свойств вакцины;
- разработать методы контроля активности каждого компонента вакцины против клостридиозов.

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

Степень обоснованности диссертационных исследований следует из результатов анализа литературных и экспериментальных данных, полученных в ходе исследований. Автором изучены и критически проанализированы публикации и теоретические положения отечественных и иностранных исследователей, касающиеся вопросов этиологии, патогенеза, специфической профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец. Основные научные положения, выводы и рекомендации по использованию научных выводов сформулированы исходя из результатов исследований 2913 проб материала от 983 коров и 119 телят различного возраста из 32 хозяйств 16 регионов РФ, данных ФГБУ «Центра ветеринарии» по заболеваемости КРС и МРС анаэробными инфекциями, а также экспериментальных данных по разработке поливалентной вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота «Клостбовак-8», позволяющей профилактировать восемь наиболее клинически значимых анаэробных инфекций.

Андрей Владимирович Капустин провел большую, многоплановую и последовательную работу для достижения поставленных целей. Объем материалов и методов исследований достаточно для получения объективных и обоснованных результатов. Экспериментальный материал подвергнут статистической обработке.

Результаты исследований не вызывают сомнений как по достоверности полученных данных, так и по выводам, сделанных на их основе. Представленные в работе научные положения обоснованы и подтверждены экспериментальными данными и производственными испытаниями.

Таким образом, анализ полученных результатов позволил автору высказать ряд положений, которые четко обоснованы и подтверждены данными собственных исследований, а сформулированные на их основе выводы и рекомендации полностью соответствуют представленным материалам.

Достоверность результатов и новизна исследований и полученных результатов.

Достоверность диссертационного исследования Капустина А.В. гарантирована достаточностью материала, в том числе экспериментального, его адекватностью поставленным задачам. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим

материалом, что позволяет считать полученные результаты достоверными, сделанные выводы обоснованными и вытекающими из результатов проведенных исследований.

Автором впервые в России разработана и внедрена в ветеринарную практику поливалентная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота «Клостбовак-8», позволяющая профилактировать восемь наиболее клинически значимых анаэробных инфекций. Разработана технология изготовления вакцины, основанная на современных методах культивирования клостридий и получения анатоксинов. Автором определены основные параметры поливалентной вакцины: оптимальное соотношение компонентов, продолжительность иммунитета, безопасность для различных видов животных, антигенная и иммуногенная активность поливалентной вакцины и ее эффективность в условиях хозяйств, неблагополучных по клостридиозам.

Автором разработан способ контроля иммуногенной активности поливалентной вакцины, позволяющей 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 *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. oedematiens*, *Cl. tetani*, *Cl. chauvoei*.

Новизна исследований, представленных в диссертационной работе Капустина А.В., очевидна, она подтверждена патентом РФ на изобретение.

Значимость для науки и практики полученных соискателем результатов.

Проведенная Андреем Владимировичем Капустиным работа – серьезный труд, обогащающий знания о клостридиозах сельскохозяйственных животных. Результаты диссертационной работы имеют существенное значение для науки и практики, поскольку они не только расширяют представление о роли возбудителей анаэробных инфекций, но и позволяют решить специфическую профилактику клостридиозов сельскохозяйственных животных.

Практическая ценность работы состоит в том, что автором разработана, зарегистрирована и внедрена в производство инактивированная поливалентная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота «Клостбовак-8». При этом усовершенствована технология изготовления анатоксинов клостридий методом мембранной фильтрации. Разработана и утверждена нормативная документация на методы изготовления и контроля качества производственных штаммов клостридий. На поливалентную вакцину разработаны нормативные документы, регламентирующие ее изготовление, контроль и применение, в частности:

- Промышленный технологический регламент на производство и контроль качества вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «Клостбовак-8» (утвержден Генеральным директором ООО «Ветбиохим»);

- Технические условия на «Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «Клостбовак-8» (утверждены Генеральным директором ООО «Ветбиохим», согласованы Заместителем Руководителя Россельхознадзор);

- Инструкция по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «Клостбовак-8» (согласована Заместителем Руководителя Россельхознадзор).

Широкое внедрение поливалентной вакцины «Клостбовак-8» в ветеринарную практику РФ безусловно будет способствовать повышению эффективности проводимых лечебно-профилактических мероприятий при клостридозах овец и крупного рогатого скота.

Материалы, представленные в диссертационной работе, могут быть использованы в научно-исследовательской и практической работе ветеринарных специалистов, при написании монографий, справочных пособий, в учебном процессе.

Соответствие диссертации, автореферата и публикаций критериям «Положения о присуждения ученых степеней».

Автореферат оформлен методически верно, содержит основные разделы диссертации и раскрывает ее научные положения. Выводы и практические предложения в автореферате и диссертации идентичны. Диссертация и автореферат соответствует критериям «Положения о присуждения ученых степеней».

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы. Научное исследование выполнено соискателем ученой степени самостоятельно, в ходе которого проведен анализ научной литературы по теме диссертации, поставлена цель и определены задачи, освоены современные и классические методики исследований с последующей статистической обработкой полученных результатов, сформулированы основные положения и выводы диссертации. Опубликованные результаты исследований подтверждают значительный вклад диссертанта в решение поставленных задач.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность и замечания по оформлению.

Диссертационная работа Капустина А.В. построена по традиционному плану и состоит из разделов: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практическое использование результатов исследований, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список использованной литературы, приложения.

Диссертация изложена на 288 страницах компьютерного текста, содержание иллюстрировано 35 таблицами и 23 рисунками. Список литературы включает 279 источников, в том числе 136 иностранных авторов.

Во введении автором лаконично изложен методологический аппарат диссертационного исследования с обоснованием выбора темы и краткой информацией о её современном состоянии. На основе сформулированной проблемы отражены цель и задачи исследований; научная новизна; теоретическая и практическая значимость работы; основные положения, выносимые на защиту; методология и методы исследований; степень достоверности и апробация результатов работы; публикации; личный вклад автора в проведенные исследования; объем и структура диссертации.

В обзоре литературы, состоящем из 7 разделов, автором анализируются наиболее значимые, современные отечественные и зарубежные литературные источники, приведены данные мониторинга клостридиозов животных. Подробно дана характеристика возбудителей клостридиозов и вызываемых ими болезней, а также методы диагностики и профилактики болезни. Отдельно рассмотрены прикладные аспекты создания поливалентной вакцины для специфической профилактики клостридиозов, технологии культивирования клостридий для изготовления вакцины, а также методы контроля ее иммуногенной активности. Четко обозначены нерешенные проблемы, которым посвящено диссертационное исследование. Все упомянутые в тексте работы присутствуют в библиографическом списке.

В подразделе «Материалы и методы исследования» автор приводит объем и схему комплексных поэтапных исследований. Методы и методология исследований адекватны поставленным целям и задачам, они соответствуют современному уровню. В работе применялись клинико-эпизоотологические, серологические, бактериологические, иммунобиологические методы исследований, которые обеспечили получение научно-обоснованных и достоверных данных по изучаемым вопросам. Приводится описание основных методических приемов, использованных автором в ходе выполнения работы, включая методы статистической обработки данных. Глава написана подробно и не вызывает возражений.

Результаты исследований описаны в четвертой главе, которая разбита на 11 подглав.

На начальном этапе автором изучена этиологическая структура клостридиозов КРС и овец путем анализа отчетов ветеринарных лабораторий, представленных ФГБУ «Центр ветеринарии», а также исследованием патологического материала от павших и вынужденно убитых животных из 32 хозяйств 16 регионов РФ. Установлено, что в РФ ежегодно регистрируется значительное количество случаев различных анаэробных болезней, среди которых преобладают анаэробная энтеротоксемия и злокачественный отек, но количество неблагополучных пунктов за последнее десятилетие неуклонно снижается.

С целью усовершенствования диагностики и ускорения процесса изоляции и идентификации культур *Clostridium spp.* автором разработана схема биохимической идентификации грамположительных палочковидных бактерий, позволяющая быстро дифференцировать изоляты грамположительных бактерий

по таким признакам как наличие эндоспор, каталазная активность и толерантность к кислороду.

При бактериологическом исследовании патологического материала от крупного рогатого скота диссертантом выделены 16 видов возбудителей клостридиозов, но наиболее клинически значимыми признаны *Cl. septicum*, *Cl. perfringens* типы А, С и D, *Cl. tetani*, *Cl. sordellii*. У телят наиболее распространенным заболеванием является анаэробная энтеротоксемия, вызываемая *Cl. perfringens* типами А, С и D. Злокачественный отек у взрослых животных развивается, как правило, после отелов, реже при травмировании тканей.

Огромный практический интерес представляют результаты исследований Капустина А.В. по усовершенствованию технологии изготовления вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота и овец, по разработке многокомпонентной вакцины. При выполнении этой цели диссертант на первом этапе изучил и изыскал производственные штаммы клостридий, обладающие стабильно определенными свойствами - образование в питательных средах токсинов в высоких титрах и способность их индуцировать иммунный ответ у подопытных животных. Для повышения способности штаммов к образованию токсинов автором проведена работа по селекционированию культур путем пассирования их через организм восприимчивых животных. В результате осуществлено изготовление и аттестация Master Seed производственных штаммов клостридий для производства вакцины «Клостбовак-8» в ОБК ООО «Ветбиохим».

Следующим этапом работы являлся подбор питательной среды для культивирования производственных штаммов, способствующей накоплению токсинов в высоких титрах. При этом учитывался не только состав питательной среды, но и ростовые индивидуальные потребности каждого штамма. Была отработана методика изготовления анатоксинов всех видов клостридий на питательных средах на основе гидролизата казеина без добавления мясных составляющих. Добавление в среду перед засевом дрожжевого экстракта и витаминов группы В способствовало более высокому накоплению целевого продукта. Таким образом, было установлено, что замена мясо-печеночных сред при культивировании клостридий на казеиновые среды с содержанием казеина не менее 5%, позволяет более чем в два раза увеличить образование специфических токсинов.

При разработке поливалентной вакцины вначале были получены моно-антигены на основе модифицированной среды, изучена на лабораторных животных способность каждого из них индуцировать специфические антитела. В итоге была разработана технология культивирования производственных штаммов клостридий в условиях ферментера, которая устанавливала сроки культивирования для каждого вида клостридий, методы инактивации токсина, концентрирование очищенного анатоксина. При этом определено эффективное количество каждого компонента, а также их соотношение в препарате. С этой целью в начале изучалась активность монопрепаратов, изготовленных в виде анатоксинов на лабораторных животных. Установлено, что активность

анатоксинов различных видов клостридий отличаются достаточно сильно. Результаты эти исследования позволили автору определить наиболее оптимальную иммунизирующую дозу каждого из них, что в последствии было использовано при компоновке экспериментальных серий вакцины.

Проводилось изучение безвредности, антигенной и иммуногенной активности каждой экспериментальной серии вакцины «Клостбовак-8» на лабораторных животных, результаты которых показали, вакцина безвредна для животных, обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью в отношении компонентов *Cl. perfringens* типов *A, B, C, D*, *Cl. tetani*, *Cl. novae* (*Cl. oedematiens*), *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*, обеспечивая выживаемость не менее 80% лабораторных животных. Проведенное сравнение иммуногенности поливалентной вакцины позволили установить отсутствие интерференции антигенов в вакцине, а в некоторых случаях наличие синергидного эффекта. Так, совместное использование компонентов *Cl. perfringens* типов *C* и *D* позволили увеличить титры антител к альфа-токсину *Cl. perfringens* типа *A*, а также полностью защитить от гибели животных, зараженных *Cl. perfringens* типом *B*.

Установлено, вакцина «Клостбовак-8» вызывает формирование иммунитета у крупного рогатого скота и овец против эмфизематозного карбункула, бродзота, злокачественного отека, некротического гепатита, анаэробной дизентерии ягнят, энтеротоксемии, синдрома «размягченной» почки, столбняка через 3 недели после повторного введения, продолжительностью не менее 12 месяцев. Вакцина стала первым отечественным препаратом, позволяющей одновременно профилактировать восемь наиболее клинически значимых анаэробных инфекций.

Большой научный и практический интерес представляют результаты доклинических и клинических исследований вакцины. Установлено, что вакцина безвредна для всех видов и возрастных групп животных. Производственные испытания вакцины в скотоводческих и овцеводческих хозяйствах РФ показали, что она обладает высокой профилактической эффективностью. Применение вакцины в стационарно неблагополучных хозяйствах позволяет полностью остановить возникновению новых вспышек болезней клостридиозной этиологии, таких как эмфизематозный карбункул, бродзот, злокачественный отек, анаэробная энтеротоксемия.

Результаты исследований позволили авторам разработать и внедрить в ветеринарную практику РФ первую отечественную вакцину против клостридиозов крупного рогатого скота и овец «Клостбовак-8». Препарат зарегистрирован Россельхознадзором и широко применяется в ветеринарной практике РФ.

Заключение представляет анализ полученных данных в сопоставлении с материалами, имеющимися в литературе, а также включает в себя 11 выводов, которые резюмируют выполненную Капустиным А.В. работу и вытекают из результатов собственных исследований.

Работа хорошо апробирована. Ее результаты были представлены на 6 научно-практических конференциях различного уровня, опубликованы

32 научные работы, из них 25 в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки РФ, 1 методические указания и 1 патент РФ на изобретение.

В целом работа представляет завершённый, хорошо оформленный и убедительно иллюстрированный научный труд.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

Отмечая в целом актуальность, новизну и научно-практическую значимость проведенных исследований, оценивая положительно диссертационную работу Капустина А.В., хотелось бы получить разъяснения на ряд вопросов, возникших при ознакомлении с работой:

1. На стр. 105 приведены официальные данные о распространенности инфекций, вызванных анаэробными микроорганизмами. Считаете ли Вы их реальными и объективно отражающими эпизоотическую ситуацию в стране?

2. При проведении бактериологических исследований для идентификации клостридий использованы импортные диагностические наборы. Насколько, по Вашему мнению, заложенный в них видовой спектр позволяет реально определить видовую принадлежность анаэробов, и есть ли на рынке отечественные средства диагностики клостридиозов.

3. Вами приведена схема изучения этиологической структуры клостридиозов, полученная на основе собственных бактериологических исследований, насколько полученные результаты согласуются с данными других исследователей в России и за рубежом?

4. Есть ли принципиальные различия в схеме производства разработанного Вами препарата против клостридиозов, и другими аналогичными вакцинами, выпускаемыми отечественными биопредприятиями?

Вышеуказанные вопросы не снижают положительной оценки оппонируемой диссертационной работы, поскольку они отчасти носят дискуссионный характер и вызваны интересом к этой работе.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Диссертационная работа Капустина А.В. на тему: «Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец», представленная в диссертационный совет Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важных теоретических и прикладных задач, связанных с изучением этиологии и разработкой средств специфической профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец, имеющих существенное значение для ветеринарной науки и практики. Актуальность

темы, новизна, научно-практическая значимость результатов, научных положений и практических предложений позволяют констатировать, что диссертация Капустина А.В. соответствует критериям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени доктора биологических наук п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией бактериальных инфекций ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», доктор биологических наук

Геннадий Николаевич
Спиридонов

10 сентября 2019 г

420075, г. Казань, Научный городок-2. ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Тел: (843)239-53-37; e- mail: vnivi@mail.ru

Подпись Г.Н. Спиридонова заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
кандидат биологических наук

Юлия Вадимовна
Ларина

