

**ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу Капустина Андрея Владимировича «Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец», представленную к защите в диссертационный совет Д 006.033.02 при ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 - «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»

Актуальность темы

Создание индустриального животноводства с крупнейшими по численности и плотности популяций животных хозяйствами, ухудшение экологической ситуации и иммунной реактивности организма; нерациональный концентрационный тип кормления; широкое бесконтрольное использование антибиотиков и гормональных препаратов для лечения больных животных – всё это приводит к значительным изменениям в структуре экосистем, способствует включению в эпизоотический процесс ранее неизвестных возбудителей, изменению свойств и путей циркуляции известных ранее микроорганизмов, а также к значительным изменениям реактивности и восприимчивости макроорганизма, что осложняется различными инфекционными болезнями, такими как злокачественный отек и другие клостридиозы, вызывающие у крупного рогатого скота и овец массовые вспышки.

Возбудители болезней анаэробной этиологии (злокачественный отек, некротический гепатит, бразот, эмфизематозный карбункул, столбняк, анаэробная энтеротоксемия, анаэробная дизентерия и др.) вызывают обширные поражения различных тканей организма, быстро нарастающий токсикоз, гангренозные поражения органов и, в большинстве случаев, гибель животного. Клостридиозы являются серьёзной проблемой скотоводства не только за счёт нанесения экономического ущерба из-за заболевания и гибели животных, но также из-за возникновения стойкого неблагополучия

местности, контаминированной спорами возбудителей и потерями от наложения карантинных мероприятий и ограничений. Своевременная вакцинация является практически единственным надёжным способом борьбы со злокачественным отёком, эмфизематозным карбункулом, столбняком, анаэробной энтеротоксемией, некротическим энтеритом и другими клостридиозами.

Многообразие симптомов проявления бактериальных болезней и их ассоциаций, требует постоянного совершенствования средств специфической профилактики, разработки новых технологий изготовления, использование многокомпонентных вакцин. Поскольку на рынке отсутствовали отечественные ассоциированные вакцины против анаэробных болезней крупного рогатого скота и овец, диссертантом была поставлена задача разработать ассоциированную вакцину против клостридиозов, наиболее часто выступающих этиологическими агентами инфицирования животных в Российской Федерации.

В связи с этим, разработка многокомпонентной вакцины против наиболее клинически значимых клостридиозов животных, совершенствование технологии изготовления и контроля моно-анатоксинов и бактериальных антигенов, представляет особый научный и практический интерес,

Научная новизна диссертационной работы

Впервые в Российской Федерации разработана, испытана с положительным эффектом и внедрена в ветеринарную практику поливалентная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота, позволяющая профилактировать восемь наиболее клинически значимых анаэробных инфекций, вызываемых *C. chauvoei*, *C. perfringens* тип А, С и D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. tetani*; определён видовой спектр возбудителей клостридиозов крупного рогатого скота, наиболее этиологически значимых в настоящее время; научно обоснована и внедрена в практику технология изготовления вакцины против клостридиозов

животных, основанная на современных методах культивирования, инактивации, концентрирования анатоксинов клостридий мембранными методами; определены основные параметры поливалентной вакцины: оптимальное соотношение компонентов, отсутствие интерференции компонентов, сроки наступления и продолжительность иммунитета, безопасность для различных видов животных, иммуногенная и антигенная активность, специфическая эффективность вакцинации; разработан количественный способ контроля иммуногенной активности препарата, позволяющий оценить напряжённость иммунитета у вакцинированных животных к клостридиозам; разработаны методические рекомендации по диагностике клостридиозов животных.

Значимость для науки и производства полученных автором результатов

Полученные автором диссертационной работы результаты использованы в организации производства отечественного биопрепарата: зарегистрирована и внедрена в производство инактивированная поливалентная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота «Клостбовак-8». Серийный выпуск препарата производит ООО «Ветбиохим», выпущено и реализовано более 1 млн. доз; разработана и внедрена в практику современная технология изготовления токсоидов клостридий методом мембранной фильтрации; разработан количественный способ контроля иммуногенной активности препарата, позволяющий оценить напряжённость иммунитета у вакцинированных животных, разработана национальная нормативная документация, которая утверждена в установленном порядке; на основе материалов диссертации апробированы МУК «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», утверждённые РАН РФ 21.05.2017 г.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность

Представленные в работе научные положения обоснованы и подтверждены результатами производственных комиссионных испытаний. Экспериментальные данные, выводы, рекомендации основаны на

общепринятых теоретических закономерностях, не противоречат и согласуются с известными концепциями в данной области исследований.

Достоверность и обоснованность научных результатов и выводов, полученных диссертантом, основываются на согласованности данных эксперимента и научных выводов.

Достоверность экспериментальных данных обеспечивается применением современных биотехнологических методов исследования, выполненных на оборудовании с высоким классом точности, корректным применением статистических методов обработки экспериментальных данных. Обработку результатов экспериментов (с числом повтора более 3) проводили статистическими методами анализа и обработки данных.

Научные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации обоснованы, апробированы и одобрены широким обсуждением на международных научно-практических конференциях, поэтому их достоверность также не вызывает сомнений.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты исследований Капустина А.В. представляют теоретическую и практическую ценность по использованию новых знаний для внедрения в биологическую промышленность РФ технологии получения отечественной эффективной вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота.

Результаты исследований Капустина А.В. использованы при составлении национальных научно-нормативных документов, утверждённых в установленном порядке. Результаты, полученные при выполнении исследований, составляют основу разработанных методических указаний (МУК) «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», включающих современные методы диагностики клостридиозов, в том числе идентификации наиболее этиологически значимых видов возбудителей.

Диссертантом 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. Способ контроля иммуногенной активности включен в нормативно-технические документы (промышленный регламент, СТО организации) по изготовлению и контролю вакцины «Клостбовак-8».

Разработана и утверждена нормативно-технические документы по изготовлению и контролю качества производственных штаммов клостридий: СТО на штаммы *C. perfringens* *muнов A, C и D*, *C. septicum*, *C. novyi muн B*, *C. tetani*, *C. chauvoei*.

В результате проведения производственных испытаний по оценке эффективности разработанной автором диссертации вакцины, было установлено, что она отвечает требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим лекарственным препаратам, и может быть рекомендован для внедрения в ветеринарную практику.

Степень завершения диссертационной работы и качество её оформления

Диссертационная работа Капустина Андрея Владимировича представляет собой полностью законченное исследование по указанной теме, выполненное на высоком методическом уровне с использованием современных методов анализа. Диссертация хорошо оформлена, грамотно написана, логично построена.

Общая оценка содержания диссертации

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

В разделе «Обзор литературы» дана характеристика возбудителей клостридиозов, обсуждены вопросы диагностики и специфической профилактики клостридиозов у животных. Широко освещены диссертантом

особенности культивирования клостридий с целью получения максимального уровня моно-анатоксинов. Автор провёл разработку национальных требований к вакцине на базе основных законов, регламентирующих получение высококачественной продукции, например ФЗ- №61 «Об обращении лекарственных средств», «О ветеринарии» и др., а также с использованием действующих стандартов на ветеринарные препараты: ГОСТ 4.492-89 и ГОСТ Р 52249-2004, НД №13-5-2/1062. Вопросы контроля иммуногенной активности вакцин против клостридиозов животных проанализированы диссертантом в полном объёме, интересны данные о стандартизации ветеринарных препаратов по международным и национальным требованиям.

Приведённый Капустиным А.В. обзор по избранной теме отражает настоящее состояние вопроса, одновременно показывает, что диссертант анализирует материал литературы и обосновывает необходимость проведения настоящей работы.

В разделе «Материалы и методы» диссертант представляет штаммы микроорганизмов, стандартизированные антитоксические сыворотки и лиофилизированные токсины, с которой он работал, приводит список реактивов, растворов, питательных сред, животных, оборудования и методы работы.

В разделе «Результаты собственных исследований» представлены данные по определению этиологической структуры клостридиозов в РФ; автором проведено собственное эпизоотологическое обследование 32 хозяйств 16 регионов РФ по распространению клостридиозов. Диссертант провёл самостоятельно бактериологические исследования, селекционировал производственные штаммы клостридий, обеспечив их высокую токсигенность и стабильностью, подобрал оптимальный состав питательной среды и отработал режимы культивирования. Капустиным А.В. обоснованы и оптимизированы параметры процесса культивирования для достижения целевого профиля анатоксинов, отработаны методики детоксикации и

инактивации культуральной жидкости. Диссертант даёт оценку показателям качества моно-антигенам, а также представляет обоснование и определение эффективной дозы каждого компонента в составе ассоциированной вакцины. Представлены результаты разработки процессов очистки и концентрирования моно-антигенов, методов контроля антигенной и иммуногенной активности вакцины, длительности иммунитета, изучение стабильности в процессе хранения и обоснованность срока годности, масштабирование технологии до промышленного уровня. Широко представлены результаты клинического испытания эффективности вакцины на восприимчивых животных.

В разделах «Обсуждение полученных результатов исследований» «Заключение», соискатель обобщил результаты исследований по изучаемым вопросам и провел сравнительный анализ данных. Это позволило сделать заключение, что внедрение в практику разработанной автором вакцины, методов получения высокоактивных антигенов и анатоксинов будет способствовать обеспечению эпизоотологического благополучия, улучшению качества ветеринарных биопрепаратов.

В приложении представлены документы, утверждённые в установленном порядке.

Работа завершается 11 выводами, которые логически вытекают из результатов выполненной работы, и практическими предложениями.

По теме диссертации опубликовано 32 научные работы, из них 25 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, в том числе 1 патент РФ на изобретение.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные материалы, изложенные в диссертации, и соответствует положениям, выносимым на защиту и выводам диссертационной работы.

Замечания по работе

Анализ материалов диссертации Капустина А.В. указывает на то, что работа выполнена на высоком методическом уровне, представлена значительным количеством экспериментальных данных, которые автор систематизирует объективно и логично. Принципиальных замечаний по диссертации нет, однако стоит указать на некоторые стилистические погрешности, например в тексте дважды указан рис. 1б, и ошибки, и задать следующие вопросы:

1. Чем Вы можете объяснить значительное снижение зарегистрированных случаев заболевания крупного рогатого скота и овец в РФ за анализируемый период (10 лет)?

2. Отечественные биофабрики выпускают несколько вакцин против клостридиозов овец, используя аналогичные штаммы. Если штаммы одни, то чем отличаются эти препараты от вакцины «Клостбовак-8».

3. С какой целью в состав препарата был введен анатоксин *Clostridium perfringens* тип А, если известно, что различные типы возбудителя имеют схожие биологические свойства, образуют комплекс токсинов и обладают перекрестным иммунитетом?

Заключение

Диссертационная работа Капустина Андрея Владимировича является законченной научно-квалификационной работой, отражающей решение проблемы специфической профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец, в рамках которой создана и внедрена в практику высокоэффективная ассоциированная вакцина нового поколения на основе анатоксинов возбудителей клостридиозов, обладающих высокой антигенной и иммуногенной активностью и широким спектром действия, а также разработаны современные методические указания по диагностике анаэробных инфекций.

Диссертационная работа Капустина А.В. имеет внутренне единство, представляет собой законченное научное исследование, которое по

актуальности выбранной темы, новизне и уровню выполненных исследований, по объёму экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов, полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановлением №842 Правительства РФ от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор – Капустин Андрей Владимирович заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 - «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология».

Официальный оппонент,
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., Щёлковский 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»,
кандидат биологических наук

Фролов Юрий Дмитриевич

04.09.2019 г.

