

В ФГБНУ «Федеральный научный центр -
Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и
Я.Р. Коваленко Российской академии наук»
109428; г. Москва, Рязанский проспект, дом 24, к.1

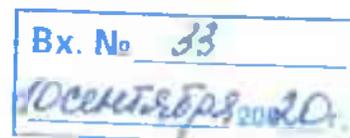
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ОТЗЫВ

на автореферат диссертации и диссертационную работу Якимовой Эльвиры Алексеевны: «Биологические свойства штаммов возбудителя риимереллѐза водоплавающих птиц, выделенных на территории Российской Федерации» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 — ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, представленные в диссертационный совет Д 006.033.02 при ФГБНУ «Федеральный научный центр-Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И Скрябина и Я.Р Коваленко Российской академии наук»

Тема диссертации Э.А.Якимовой посвящена изучению биологических свойств штаммов возбудителя риимереллѐза водоплавающих птиц, выделенных на территории РФ.

Инфекция, вызываемая *Riemerella anatipestifer*, широко известна с 1932 года. Первое сообщение относится к 1904 г. и принадлежит О. Riemer, который впервые описал *R.anatipestifer*-инфекцию у гусей. Инфекция имеет широкое распространение в популяции природных водоплавающих птиц, домашних уток, индеек, гусей в ряде стран, приносит значительный экономический ущерб. *R.anatipestifer* распространена повсеместно и является причиной серьезных проблем для птицеводческих предприятий по разведению уток, гусей и индеек.

Типовой штамм был изолирован из крови утенка и идентифицирован в 1954 году. Все аспекты, связанные с выделением возбудителя, его полного генома, биологических свойств, серотипической принадлежности, клинического и патологоанатомического проявления болезни, диагностики и специфической профилактики (вакцинных препаратов) инфекции, вызываемой *R. anatipestifer*, достаточно широко представлены в зарубежных научных публикациях. В русскоязычной научной литературе имеются только отдельные сообщения: описание риимереллѐза представлено в книге В.А.Бакулина: *Болезни птиц*. 2006 (стр.280-282), А.Алиева и др. в книге: *Болезни водоплавающих птиц*-2012; в статьях В.А.Бакулина и М.А. Васильевой (2016), Р. Лизуна (2015, Республика Беларусь), С. Перез (2014), однако не все значимые публикации представлены в обзоре литературы. Заслуживает внимание также информация А.В. Потехина (2018), который анонсировал регистрацию вакцины против риимереллѐза в 2018 году на основе штаммов, выделенных на фабрике «Донстар» - предприятии по выращиванию пекинских уток.



1. Как анонсировано в диссертации, «научная работа выполнена в период с 2016 по 2019 гг. на базе ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН» в лаборатории микробиологии с музеем типовых культур без указания, в рамках каких научно-технических программ и планов НИР она выполнялась. В отчетах по НИР нет сведений о проведении исследований и результатах по вышеназванной теме диссертации.

Исходя из цели и первой задачи исследований: «Цель работы: изучить распространенность риимереллэза в Российской Федерации и биологические свойства возбудителя инфекции *Riemerella anatipestifer*. Для достижения цели поставлены следующие задачи: Изучить эпизоотическую ситуацию по риимереллэзу водоплавающей птицы на территории отдельных регионов Российской Федерации и выявить возбудитель болезни *R. anatipestifer*.¹» следует, что Э.А. Якимова обследовала птицеводства различных регионов РФ, причем самостоятельно, поскольку в диссертации не указано иное и личный вклад в диссертационное исследование не определен, следовательно, нарушен п. 10 Положения, поскольку должен быть четко указан личный вклад автора в теоретическую и экспериментальную части исследования.

В портфолио аспирантки Э.А.Якимовой², врача-терапевта ветеринарной клиники «ДоброВет», тема диссертационной работы обозначена как «Изучение распространенности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов организма экзотических видов птиц. Оптимизация лечебной тактики при бактериальных и микологических инфекциях». Вторая позиция для выполнения диссертации является более приемлемой для врача-терапевта московской ветклиники, поскольку одновременно работать в Москве и самостоятельно обследовать 12 регионов РФ в поисках возбудителя риимереллэза водоплавающих птиц, на мой взгляд, невозможно.

2. В разделе Клинико-морфологическое проявление риимереллэза диссертант отмечает, что изучение эпизоотической ситуации, клиническое обследование, патологоанатомические исследования и отбор материалов проводились на промышленных и частных птицеводческих предприятиях (в автореферате на птицеводческих предприятиях с последующим уточнением: 12 утководческих предприятий) 12 регионов РФ, от Алтая до Краснодарского края, однако не дана характеристика и наименование этих предприятий, отсутствует документальное подтверждение проведения указанных исследований в этих предприятиях. Остается неизвестным, кем и какими структурами предоставлены материалы отстрелянной³ дикой перелетной птицы (не указаны виды) из различных регионов РФ, какие разрешительные документы на её отстрел были предоставлены.

3. Описание клинического и патолого-анатомического проявления инфекции в диссертации и в автореферате существенно различается. При этом приводятся

1 см. стр. 6 диссертации

2 см. официальный сайт ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://viev.ru/aspirantura/portfolio-aspirantov/yakimova-elvira-alekseevna/> дата обращения 8.08. 2020

3 см. стр. 32 диссертации. В тексте «отстреленной»

рисунки патолого-анатомических изменений у 25-дневного гусенка, а исследования проводились в утководческих предприятиях. Гуси, как объект исследования, в диссертации не указаны⁴. Рисунки 1, 2, 3, 4, 5 полностью заимствованы из статьи А.И. Лаишевцева с соавт.: «Клинико-морфологическое проявление риимереллёза водоплавающей птицы и биологические особенности возбудителя заболевания», DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-11.71>, где эти рисунки представлены как фотографии. Диссертант Э.А.Якимова не является соавтором этой статьи. В опубликованной статье приведено «описание первых официально зафиксированных случаев риимереллёза в РФ, особенности его клинико-морфологического проявления среди поголовья уток и гусей» (цит. по резюме).

4. В характеристике выделенных изолятов *R. anatipestifer* Э.А.Якимова приводит рис. 12 и 13⁵, характеризующие «рост бактерий на кровяном агаре». Приведенные рисунки также заимствованы из указанной выше статьи без ссылки на источник заимствования, где данные рисунки представлены как фото 8 и 9, показывающие «рост *Riemerella anatipestifer* на кровяной среде». На рис.14 диссертантом показана морфология *Riemerella anatipestifer* на кровяном агаре (окраска по методу Грама). Этот рисунок представлен в опубликованной статье как фото 7 «Клетки *Riemerella anatipestifer* при окрашивании методом Грама» (в том и другом случае аналогичные подписи к рисункам и фото).

5. Изучение антигенных свойств штаммов *R.anatipestifer* по определению титра специфических антител в реакции агглютинации выполнено методически некорректно с введением в состав так называемых «моновакцин» адьюванта гидроокиси алюминия без указания его количественной характеристики. Из приведенной таблицы⁶ видно, что антигенная активность испытанных штаммов очень низкая, даже с учетом введения в состав адьюванта. Различия титра антител по большинству штаммов после повторной иммунизации составляют одно-два разведения сыворотки крови, что является статистически недостоверным. Это относится и к штаммам №№ 549, 566 и 490, обладающих наибольшей вирулентностью. На основании каких вычислений сделано заключение, что «все штаммы обладают антигенной активностью в диапазоне значения от 1:93 до 1:173», средние арифметические показатели не принимаются в расчет. О чём свидетельствуют приведенные показатели в графах 6 и 7, каким образом они получены?

6. Изучение перекрестной антигенной активности штаммов в РА по средним арифметическим титрам для определения их серотиповой принадлежности не может быть принято, поскольку в работе не использованы эталонные штаммы с известной серотиповой принадлежностью и соответствующие антисыворотки. Заключение об «отнесении штаммов к одному, ко второму, к третьему серотипу как и то, «что в обследованных птицеводческих предприятиях циркулируют как

4 см. стр. 7 диссертации

5 см. стр. 52 диссертации

6 см. стр. 65 и 66 диссертации

минимума три серотипа» (цит. по тексту), является необоснованным. Референсные штаммы *R. anatipestifer*, представляющие 21 серотип и их источники, хорошо известны и используются для получения референсных антисывороток для серотипирования выделяемых штаммов. Результаты изучения иммуногенной активности штаммов, как и предположение о том, «что минимальный защитный уровень антител при риимереллёзе должен быть не менее 1:106», не являются убедительными, в работе нет прямых данных по определению зависимости напряженности иммунитета от титра антител.

7. В разделе клинических испытаний экспериментальной серии вакцины на птицеводческом предприятии нет сведений, что представляет собой экспериментальная серия, её компонентный состав и другие характеристики. При определении эффективности вакцины показано, что сохранность молодняка опытной группы составила 96,32%, а контрольной — 93,76% (разница составила 2,56%). Остается неизвестным, каким образом получены эти цифры. Акт клинических испытаний в Приложении 8 представлен не в полном объеме, что не позволяет оценить достоверность приведенных результатов о сохранности птицы.

8. Испытание антигенной активности в производственных условиях показало низкую антигенную активность при двукратном применении. Средние арифметические значения титра антител составляют после двукратной иммунизации менее двух разведений сыворотки крови, что является статистически недостоверным, при этом защитный уровень титра антител составляет 1:106. В работе по существу отсутствует статистическая обработка результатов, статистические методы анализа. О какой антигенной и иммуногенной активности вакцины может идти речь? Заключение диссертанта, что «вакцина против риимереллёза водоплавающей птицы инактивированная «РеймерДак-ВИЭВ» является иммуногенным и эффективным иммунобиологическим препаратом, обладающим протективной эффективностью при использовании в неблагополучном по риимереллёзу хозяйствах», является необоснованным. Апробация вакцины проведена только в одном птицеводческом предприятии на утках с неоднозначными результатами, а вакцина анонсируется против риимереллёза водоплавающей птицы. Все экспериментальные исследования также выполнены с использованием одного вида птиц — уток.

9. Несколько замечаний по выводам диссертации. Каким образом вывод 1 о том, что впервые на территории РФ установлена циркуляция *Riemerella anatipestifer*, являющегося возбудителем риимереллёза водоплавающей птицы, соотносится с описанием первых официально зарегистрированных случаев риимереллёза на территории РФ и особенностях его проявления среди поголовья гусей и уток, см. упоминавшуюся мной статью А.И.Лаишевцева с соавторами, «Клинико-морфологическое проявление риимереллёза водоплавающей птицы и биологические особенности возбудителя заболевания», DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-11.71>, опубликованную в 2017 г.? На мой взгляд, это возможно в том случае, если текст вывода 1 был написан одним из авторов данной статьи.

10. Вывод 2 о том, что выделено и идентифицировано 88 изолятов *Riemerella anatipestifer* и *Riemerella columbina* не соответствует тексту диссертации, поскольку никаких сведений о выделении второго вида *Riemerella columbina* из рода *Riemerella*, характеристика выделенных штаммов в диссертации отсутствует. Известно, что *Riemerella columbina* главным образом ассоциируется с респираторными болезнями у голубей.

11. Вывод 3 об отнесении изолятов как минимум (дословное цитирование) к трем различным серотипам, не обоснован. Нет прямых исследований о серотиповой принадлежности выделенных штаммов, в работе не использованы эталонные штаммы *Riemerella anatipestifer* с известной серотиповой принадлежностью и источниками происхождения.

12. Вывод 5 об установлении, что лабораторной моделью для экспериментального воспроизведения риимереллёза являются птицы естественно-восприимчивых видов, не подтверждены соответствующими исследованиями. В опытах использован только один вид - утки, вывод о невосприимчивости белых мышей к заражению *Riemerella anatipestifer* оставляем без комментария.

13. Среди выводов фактически отсутствуют выводы, непосредственно отнесенные к теме диссертации, касающиеся биологических свойствах возбудителя риимереллёза водоплавающих птиц.

14. И наконец, что также является принципиально важным в оценке научно-методического уровня диссертационной работы Э.А.Якимовой. В разделе методы без соответствующих ссылок (стр.30-31) анонсировано «секвенирование микроорганизмов путем определения нуклеотидной последовательности определенного участка генома (16S rRNA) и масс-спектрометрии (MALDI-ToF)». Никаких исследований и результатов, полученных с применением этих методов, в диссертации нет, отсутствует перечень соответствующего приборного обеспечения в списке лабораторного и промышленного оборудования (стр. 27). Только предварительная идентификация штаммов основана на фенотипических характеристиках, окончательная же, видоспецифическая идентификация клинических изолятов осуществляется молекулярными методами (PCR-RFLP-анализ, являющийся классическим генотипическим методом и MALDI-TOF MS-анализ) с определенным алгоритмом последовательных манипуляций с использованием соответствующего приборного обеспечения. Видимо, не случайно в диссертации не цитируются зарубежные публикации последних лет по генетической вариативности *omp A* и 16S rRNA генов *Riemerella anatipestifer* и видоспецифической идентификации изолятов методом MALDI-TOF mass spectrometry, где излагаются алгоритмы проведения этих исследований и их интерпретация.

15. Предлагаемая вакцина, по моему мнению, абсолютно бесперспективна, поскольку содержит один штамм возбудителя болезни неизвестной серовариантной принадлежности, обладает слабой антигенной и иммуногенной активностью, даже в составе вакцинного препарата с применением адьюванта. У штаммов *Riemerella anatipestifer* отсутствует или совсем слабо выражена

перекрестная серотиповая защита, что не позволяет создать стандартизированную эффективную вакцину против риимереллёза на основании одного штамма. Иммуитет при риимереллёзе серовар-специфический, известен 21 серовар *Riemerella anatipestifer*. Эффективная специфическая профилактика может осуществляться с использованием в составе вакцинного препарата нескольких штаммов с различной серотиповой принадлежностью, которые обеспечивают защиту от гомологичных полевых штаммов. Проблемы создания эффективной вакцины против риимереллёза объясняются наличием множества серотипов, не обладающих перекрестной защитой.

В Приложении к диссертации №6 «Временная инструкция по применению вакцины против риимереллёза водоплавающей птицы инактивированной РеймеркДАК-ВИЭВ» (без указания даты её согласования) констатируется, что «вакцина изготовлена из инактивированных формалином протективных антигенов *Riemerella anatipestifer* шт. 566-ВИЭВ с полиэтиленгликолем в качестве адьюванта. В диссертации в вакцине, которая подвергалась испытаниям, в качестве адьюванта выступала гидроокись алюминия⁷. Таким образом, изучалась и испытывалась одна вакцина, а инструкция представлена по принципиально другой. В тексте Временной инструкции не определена продолжительность иммунитета после вакцинации, что это за категория - «не менее 8 недель»⁸? Штамм №566 при оценке показал низкую антигенную активность (табл.4), вторая иммунизация демонстрирует статистически недостоверную разницу в одно разведение сыворотки крови (средняя арифметическая составила 1:66 против 1:133).

16. В Приложении 8 представлен документ о депонировании штамма *Riemerella anatipestifer* №566 с указанием, что идентификация культуры проведена в ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. Никаких сведений в диссертации о проведении идентификации штаммов в ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского нет. В диссертации отсутствуют данные и по определению нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA штамма №566 с разработкой видоспецифических праймеров, не определена и серотиповая его принадлежность, не изучены и другие свойства, что в целом является недостаточным основанием для депонирования вакцинного штамма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Э.А.Якимовой не соответствует Положению о порядке присуждения ученых степеней, утвержденному Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, ввиду нарушения п.9, п.10, п.11, п.14, п.20 (д) Положения, не отвечает критерию самостоятельно выполненной научно-квалификационной работы, не определен личный вклад соискателя в получении результатов.

⁷ см. стр. 26, 64, 84 диссертации

⁸ см. стр. 114 диссертации

Соискатель не указала в диссертации соавторов работ, отсутствуют ссылки на соавторов о проведении совместных исследований, источники заимствования отдельных материалов (п.14, п.38 Положения). При нарушении п.14 диссертация снимается с рассмотрения без права повторной защиты (п.38 Положения).

В автореферате соискателем представлен список из 8 опубликованных работ в научных журналах и в сборниках научных трудов. Из них только 4 касаются темы диссертации, но эти публикации не содержат информацию по результатам основных положений диссертационной работы - биологических свойств штаммов возбудителя риимереллёза, выделенных на территории РФ. Научные работы п. 2, 4, 5 и 9 не относятся к публикациям по теме диссертации. Отсутствует полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах, нарушен п.31 Приказа Миннауки России №1093 от 10 ноября 2017 г.

Представлены недостоверные сведения об апробации материалов диссертации на Национальной научно-практической конференции: «Актуальные вопросы микробиологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения» г. Москва, 06-07 февраля 2019 г., ФГБОУ - МВА им. К.И. Скрябина. В Программе конференции нет сведений о представлении материалов диссертации Э.А. Якимовой (см. Программу конференции), отсутствуют сведения об апробации «на межлабораторных заседаниях ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН».

Считаю, что нарушение п. 14 Положения является существенным, источник неправомерного заимствования материалов диссертации мной определен верно, в связи с чем диссертация должна быть снята без права повторной защиты.