

Отзыв

официального оппонента на диссертацию **Селезневой Екатерины Валерьевны** «Разработка тест-систем для иммунодиагностики вирусной геморрагической болезни кроликов на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2», представленную к защите в диссертационный совет 24.1.249.01 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 4.2.3 - «Инфекционные болезни и иммунология животных» и 1.5.6. – «Биотехнология»

Актуальность темы. Одной из проблем инфекционной патологии в кролиководстве связано с геморрагической болезнью кроликов (ГБК), представляющей собой высоконтагиозную форму инфекционного заболевания и как правило носит летальный характер. Болезнь протекает в генерализованной форме и характеризуется проявлениями геморрагического диатеза во всех органах, но преимущественно данные изменения наблюдаются в печени и легких, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС-синдром) и быстрой гибелью животных.

Возбудителем болезни является вирус геморрагической болезни кроликов (RHDV, ВГБК) относящийся к роду *Lagovirus*, семейству *Caliciviridae*. Это вирус диаметром около 35-40 нм, икосаэдрической симметрии и линейного положительного генома РНК размером 6,4-8,5 кб. При электронной микроскопии вируса видна типичная морфология калицивируса с часто расположенными поверхностными чашевидными структурами, представляющими собой скопления капсидного белка Vp60 с молекулярной массой около 60 кД, являющегося основным структурным белком вириона.

Впервые ВГБК был обнаружен в 1984 году в Китае, откуда он распространился на большую часть Азии, Европы, Австралии и других стран мира. Выделенный вирус был идентифицирован как классический ВГБК (также называемый RHDV, RHDV1 или ВГБК-1) и впоследствии отнесен к первому типу GI.1 ВГБК. В 2010 году во Франции был выявлен новый лаговироз, вы-

зывающий ГБК, но проявляющий при этом отличительные генетические, антигенные и патогенные особенности. Вирус был назван ВГБК 2-го типа (RHDV2 или RHDVb) и впоследствии отнесен ко второй геногруппе GI.2. В последние годы ВГБК-2 распространился на большую часть Европы, а также в Австралию, Канаду и США. Основными отличительными чертами ВГБК-2 является его способность к инфицированию не только кроликов, но и зайцев. Смертность от ВГБК-2 подтверждена у кроликов, ранее вакцинированных против ВГБК-1.

В настоящее время основным методом выявления вирусного антигена ВГБК в России является реакция гемагглютинации (РГА), для определения уровня вирус-специфических антител - реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Оба метода характеризуются достаточно трудоемкостью, недостаточной по современным взглядам чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью результатов.

Кроме того, существует проблема изготовления диагностических и вакцинных препаратов, связанная с отсутствием репликации лаговирuсов в культурах клеток. Соответственно тканевым антигеном является печень инфицированных кроликов, что связано с необходимостью соблюдения строгих мер биобезопасности и биоэтики.

Поэтому, диссертационная работа Селезневой Екатерины Валерьевны, посвященная получению рекомбинантных белков ВГБК двух генотипов и разработке на их основе диагностических иммуноферментных тест-систем, является актуальной, своевременной и представляет значительный интерес в научном и практическом аспектах.

Оценка содержания работы. Рецензируемая диссертация изложена на 115 стр. компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Материалы диссертации иллюстрированы 14 таблицами и 22 рисунками. Список литературы включает 200 источников (20

отечественных и 180 зарубежных авторов). В приложении представлены копии титульных листов документов: СТО 00496165-0002-2021 «Набор для иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу геморрагической болезни кроликов в сыворотке крови»; МУК «Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в патологическом материале методом сэндвич-ИФА» ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

В разделе «Введение» диссертант обосновывает выбор темы и ее актуальность, определяет цель и задачи исследований, формулирует научную новизну и практическую значимость работы.

В обзоре литературы приведены эпизоотологические данные по ГБК, результаты отечественных и зарубежных исследователей по молекулярно-биологической и антигенной характеристике вируса, описаны патогенез, клинические признаки болезни, современные методы диагностики и профилактики ГБК, вызываемой двумя генотипами вируса.

Таким образом в обзоре литературы автор систематизировал всю имеющуюся доступную информацию, теоретически обосновав предпосылки проведения собственных исследований, изложенных в соответствующих разделах диссертации.

Экспериментальная часть работы традиционно включает в себя несколько разделов. В разделе «Материалы и методы» изложен план и определены объекты изучения. Приведено описание использованных молекулярно-биологических, биотехнологических и серологических методов исследования, статистической обработки полученных результатов.

В главах раздела «Результаты исследований» автор привел результаты собственных исследований, касающиеся изучения молекулярно-биологических свойств штамма «Тула» ВГБК 2-го генотипа, разработки технологии получения рекомбинантных главных капсидных белков VP60 (recVP60) вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в бакуловирусной системе экспрессии генов. Описаны результаты исследований по изучению антигенных и некоторые иммуногенные свойства полученных recVP60 для кроликов,

этапов разработки двух иммуноферментных тест-систем (АТ-ВГБК и АГ-ВГБК) и дальнейшего их применения.

В главе «Обсуждение результатов» проведен сравнительный анализ полученных результатов и литературных сведений по изучаемой проблеме. В заключительном разделе работы диссертант подвел итоги исследований, сформулировал 7 выводов, соответствующих задачам исследования и положениям, выносимым на защиту, изложил практические предложения по использованию результатов исследований и обозначил перспективы дальнейшей разработки темы.

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

Известно, что появление в популяции восприимчивых животных новых штаммов или генотипов вирусов, требует быстрой и эффективной разработки новых средств диагностики и профилактики вызываемых ими заболеваний.

В рецензируемой работе диссертант научно обосновал и экспериментально подтвердил необходимость изучения ВГБК двух генотипов, циркулирующих на территории нашей страны, с использованием современной диагностической методологии, базирующейся на применении рекомбинантных антигенов и моноклональных антител.

Новыми являются положения работы, связанные с изучением молекулярно-биологических свойств ранее выделенного штамма «Тула» ВГБК генотипа GI.2. Определена полная нуклеотидная последовательность и проведен филогенетический анализ генома выделенного вируса, изучены его биологические особенности. Показано, что выделенный штамм ВГБК-2 имеет высокую степень гомологии с изолятами выделенными в этот же период времени в Европе и США.

Впервые в РФ в бакуловиральной системе экспрессии генов получены рекомбинантные белки VP60 вируса ГБК 1-го и 2-го генотипов, обладающие в определенных условиях *in vitro* гемагглютинирующей активностью и спо-

способностью к самосборке в вирусоподобные частицы (ВПЧ), установлены их антигенные и некоторые иммуногенные свойства. На основе recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 разработана тест-система (АТ-ВГБК) в формате «непрямого» ИФА для выявления антител к ВГБК, с чувствительностью и специфичностью 98% и 96,6% соответственно по сравнению с зарубежным аналогом.

Автором установлено, что полученные им рекомбинантные белки в дозе 50 мкг после однократной иммунизации вызывают выраженный иммунный ответ у кроликов. По результатам экспериментального заражения установлен протективный титр специфических антител к ВГБК составляющий 1:400 в ИФА и 1:640 в РТГА соответственно.

На основе моноклональных антител к полученным рекомбинантным белкам автором разработана тест-система (АГ-ВГБК) в формате сэндвич-ИФА для обнаружения антигенов ВГБК в патологическом материале с аналитической чувствительностью 20 нг/мл. Результаты сравнительных экспериментов, проведенных с зарубежным аналогом, показали высокую практическую эффективность (диагностическую чувствительность и специфичность) разработанной тест-системы при исследовании различного биологического материала, полученного как от животных, так и в культуре клеток.

Рецензируемая работа выполнена в строгой логической последовательности, на большом фактическом материале и на современном научно-методическом уровне.

Полученные результаты объективны и не вызывают сомнения. Положения работы, связанные с получением рекомбинантных антигенов и разработке иммуноферментных тест-систем для выявления ВГБК-1 и ВГБК-2 или вирусспецифических антител, позволяющие провести идентификацию изолятов вируса, циркулирующих на территории нашей страны, являются научно обоснованными и практически значимыми.

Диссертация хорошо иллюстрирована: приведены информативные рисунки и таблицы, наглядно демонстрирующие результаты выполненных исследований.

Цифровой материал обработан статистически, что позволяет определить достоверность различий полученных результатов. Выводы достоверны и логично вытекают из содержания работы. Таким образом, можно констатировать, что диссертант выполнил поставленную цель и задачи исследования.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 5 печатных работах, в том числе 3 - в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 - в международном журнале, цитируемом в системах Web of Science и Scopus, и апробированы в виде докладов.

Автореферат отражает основные положения диссертации.

Диссертация соответствует двум указанным специальностям, правомерность их выбора не вызывает сомнения.

Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертационной работе нет, однако на несколько вопросов хотелось бы получить разъяснения от автора:

1) Уточните название моноклональных антител и их шифр, если он имеется. В тексте диссертации об этом не указано.

2) По тексту идет неточная формулировка по методологическому определению иммуноферментных тест-систем. Уточните определение каждой тест-системы, использованной для каждой конкретной диагностической задачи.

3) Большой интерес вызывают полученные данные при изучении иммуногенных свойств ГБК, с использованием рекомбинантных белков recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2, и их дальнейшее использование в составе каких иммунобиологических препаратов.

Указанные вопросы, требующие уточнения, а также встречающиеся по тексту грамматические неточности, неудачные выражения и опечатки не касаются методической стороны диссертационной работы и не снижают ее научно-практической значимости.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Разработанные иммуноферментные тест-системы могут быть использо-

ваны для диагностики вирусной геморрагической болезни кроликов, дифференциации различных изолятов и штаммов ВГБК, относящихся к двум генотипам вируса, определять распространения, выявлять источник заноса вируса и анализировать его циркуляцию в популяции домашних и диких животных.

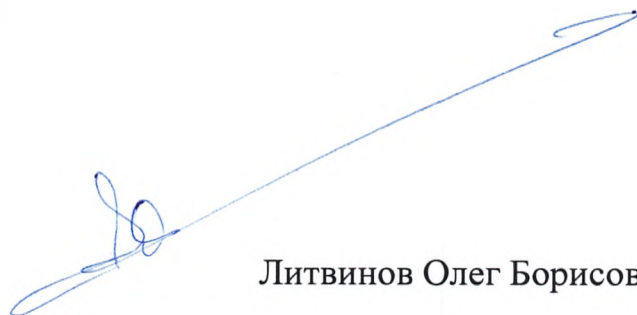
Полученные рекомбинантные белки (recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2) могут быть использованы в составе вакцин для специфической профилактики вирусной геморрагической болезни кроликов.

Заключение. Диссертация Е.В. Селезневой является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных экспериментальных исследований решена научно-практическая задача по разработке иммуноферментных тест-систем для дифференциальной диагностики геморрагической болезни кроликов, вызываемой двумя генотипами вируса, циркулирующими на территории Российской Федерации, имеющая важное значение для диагностических ветеринарных лабораторий.

Работа по своей актуальности, объему выполненных экспериментальных исследований, методическому решению поставленных задач, научной и практической значимости полученных результатов, соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с «Положением о порядке присуждения ученых степеней» (раздел II), утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор **Селезнева Екатерина Валерьевна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент:

Доктор ветеринарных наук,
профессор кафедры иммунологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО МГАВМиБ -
МВА имени К.И. Скрябина,
действительный государственный
советник третьего класса,
Почетный работник АПК РФ



Литвинов Олег Борисович

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина.

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

Тел. 8 (495) 377-91-17

Адрес электронной почты: dr.litvinoff2018@yandex.ru

Подпись профессора О.Б. Литвинова
заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина,
кандидат сельскохозяйственных наук,
доцент Маркин Сергей Сергеевич

