

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Селезневой Екатерины Валерьевны на тему «Разработка тест-систем для иммунодиагностики вирусной геморрагической болезни кроликов на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научным специальностям: 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных и 1.5.6. Биотехнология.

### **Актуальность темы**

Наблюдающийся в последнее время увеличение интереса к кролиководству обуславливает рост поголовья кроликов, содержащихся как в индивидуальных хозяйствах, так и в условиях промышленных кролиководческих комплексов. Наибольший экономический ущерб, наносимый отрасли, связан с инфекционной патологией и в первую очередь с вирусной геморрагической болезнью кроликов. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ГБК) – это инфекционное, высококонтагиозное заболевание, вызываемое вирусом из рода *Lagovirus* семейства *Caliciviridae*. Патогенные лаговирuses из геногрупп GI.1 и GI.2, наносящие огромный экономический ущерб кролиководству, циркулируют повсеместно, в том числе и на территории Российской Федерации.

Всё большую роль в патологии кроликов приобретают вирусы ГБК 2-го генотипа, которые с момента обнаружения в 2010 году во Франции «вытесняют» вирусы ГБК 1-го генотипа по всему миру. Основными отличительными чертами вируса ГБК 2-го генотипа является его способность к инфицированию не только кроликов, но и зайцев, поражение молодых крольчат и частое протекание болезни в подострой форме. Особо стоит отметить слабую перекрестную защиту от инфицирования кроликов, иммунизированных вакцинами против ВГБК, изготовленных на основе штаммов вируса ГБК 1-го генотипа, при инфицировании лаговирusesами 2-го генотипа.

Существует проблема изготовления диагностических и профилактических препаратов, которая связана с отсутствием репликации лаговирuсов в культурах клеток. Соответственно в качестве антигена для всех тест-систем и профилактических препаратов используется печень инфицированных кроликов, что связано с необходимостью соблюдения строгих мер биобезопасности и биоэтики.

### **Научная новизна**

Автором впервые определена полная нуклеотидная последовательность и проведен филогенетический анализ генома штамма «Тула» вируса ГБК генотипа GI.2.

Впервые в РФ в бакуловирусной системе экспрессии генов получены рекомбинантные главные капсидные белки VP60 вируса ГБК 1-го и 2-го генотипов и изучены их биологические свойства.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Определена полная нуклеотидная последовательность генома и проведен филогенетический анализ штамма «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа.

Разработана технология получения в бакуловирусной системе экспрессии гесVP60 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 и изучены их биологические свойства.

Разработан СТО 00496165-0002-2021 Набор для иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу геморрагической болезни кроликов в сыворотке крови.

Разработаны Методические указания МУК Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в патологическом материале методом сэндвич-ИФА ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

## **Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, приведенных в диссертации**

Достоверность полученных результатов опирается на статистическую обработку и не противоречит современным научным данным. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, вытекают из результатов проведенных исследований и подтверждены фактическим материалом. В разделе «Заключение» диссертант обобщает и анализирует полученные результаты.

## **Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»**

Диссертация Селезневой Е.В. является целостной и завершенной работой, проведенной на высоком методическом и научном уровне с использованием современных методов исследований. Результаты исследований позволили автору предложить две тест-системы для иммунодиагностики вирусной геморрагической болезни кроликов на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Диссертация и автореферат полностью отвечают требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации.

## **Личный вклад автора в разработку научной проблемы**

Диссертационная работа Селезневой Е.В. представляет собой законченный, самостоятельный труд, обладает внутренним единством. Автор самостоятельно проанализировал большое количество источников научной литературы, сформулировал тему диссертации, разработал методическую часть проведения экспериментов и выполнил весь комплекс запланированных исследований.

## **Оценка содержания, завершенность работы и качество ее оформления**

Диссертационная работа Селезневой Е.В. выполнена в классическом стиле, в ней имеются необходимые главы и разделы. Диссертация изложена на 115 страницах, содержит 22 рисунка, 14 таблиц и 2 приложения. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Список использованной литературы включает 200 источников, в том числе 180 - на иностранных языках. По материалам диссертационного исследования опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 работы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 работа в журнале, индексируемом в базе SCOPUS. Содержание опубликованных работ отражает материалы диссертационной работы. Соискателем полностью выдержано единство структуры работы, грамотно построено содержание и связь между разделами.

Во «Введении» четко и ясно обоснована актуальность и степень разработанности темы исследований, сформулированы цели и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая ценность работы, краткий обзор методологии и методов исследования, основные положения, выносимые на защиту.

В разделе «Обзор литературы» представлена всесторонняя характеристика современного состояния проблемы. Следует отметить обстоятельность, грамотность, последовательность и логичность изложения материала. Обзор литературы дает достаточно полное представление о характеристике возбудителя. Кроме того, приведены данные о патогенезе заболевания, об особенностях его клинического проявления и лабораторной диагностики. Особое внимание уделено описанию специфической профилактики заболевания.

В главе «Материалы и методы» автор указывает объекты исследований: кролики (N=100), патологический материал (N=30) и сыворотки кроликов (N=140). Собственные исследования выполнены на достаточном объеме экспериментального материала с использованием современных методов: ИФА, ПЦР, метод электрофореза белков в полиакриламидном геле, иммуноблоттинг и электронная микроскопия.

Результаты собственных исследований включают в себя подробное описание всех этапов научно-исследовательских работ, начиная с определения полной нуклеотидной последовательности и проведения филогенетический анализа генома штамма «Тула» вируса ГБК генотипа GI.2. Затем описывается получение в бакуловирусной системе экспрессии генов рекомбинантных главных капсидных белков VP60 вируса ГБК 1-го и 2-го генотипов и в дальнейшем описаны свойства полученных белков. Материалы изложены последовательно и логично.

В разделе «Заключение» соискатель довольно четко и лаконично представил обсуждение полученных результатов исследований. В ходе научной работы Селезневой Екатериной Валерьевной были получены опытные образцы рекомбинантных главных капсидных белков VP60 вируса ГБК 1-го и 2-го генотипов, которые можно применять в качестве компонентов диагностических тест-систем и вакцин. Результатами исследования стала разработка наборов ИФА АТ-ВГБК для выявления антител к вирусу ГБК в сыворотке крови и АГ-ВГБК для обнаружения антигенов ГБК в патологическом материале и культуральной жидкости в процессе получения рекомбинантные главных капсидных белков вируса ГБК

Выводы и рекомендации автора диссертационной работы обоснованы, соответствуют полученным данным, автореферат также соответствует основным положениям диссертационной работы.

В целом, работа производит положительное впечатление, хорошо иллюстрирована, написана грамотным языком и легко читается. Однако при этом считаю уместным высказать ряд замечаний:

1. Страница 2: В пункте 3.1.6 оглавления «Электрофорез в ПААГ» следует писать «Электрофорез в ПААГ-ДСН», т.к. электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия. То же самое замечание относится и к заголовку на странице 33.

2. Страница 15: «Чувствителен к хлорсодержащим дезинфектантам и щелочам (NaOH 1%, формалин 1-2%) и не чувствителен к действию растворителей липидов, сохраняет свою инфекционную и геммагглютинирующую активность при показателях рН от 3 до 9». Автор пишет про хлорсодержащие дезинфектанты, а приводит концентрацию формалина.

3. Страница 16: «Впервые в России вирус ГБК был зафиксирован в 1986 году. Начиная с 1987 года вирус регистрировали в Белоруссии, Украине, Латвии, Молдове, Казахстане, Узбекистане и Туркменистане».

Правильнее писать, что в СССР вирус ГБК был впервые зафиксирован в 1986 году на территории РСФСР, а начиная с 1987 года вирус ГБК регистрировали на территориях Белорусской, Украинской, Латвийской, Молдавской, Казахской, Узбекской и Туркменской ССР.

В 1986 году не было России, Белоруссии, Украины, Латвии, Молдовы, Казахстана, Узбекистана и Туркменистана.

4. Выявлены неточности и грамматические ошибки. Так на странице 21: «Селезенка увеличена, в ней, а также в легких, почках, сердце, а также центральной *нервной* системе наблюдается...» Опечатка — следует писать «нервной». На странице 33 допущена опечатка — в слове *N,N-метилен-бис-акриламид N,N* следует писать через запятую, вторая N со штрихом – *N,N'*-метилен-бис-акриламид. На странице 34 опечатка *в-меркаптоэтанол* пишется с греческой буквой  $\beta$ . На странице 35 опечатка «*афинной хроматографии*» - следует писать аффинной хроматографии. На странице 36 опечатка «Электронная микроскопия очищенных препаратов гесVP60-GI.1 и

ресVP60-GI.2 методом негативного контрастирования *проводилось* в АНО «НИИИДПБ» - следует писать «проводилась». На странице 42 «*четырёхкратная*» - пишется слитно — четырехкратная. На странице 75 допущена опечатка «...который показал его *схожность* с вирусами ГБК из Европы... Следует писать схожесть. Так же опечатки на страницах 77, 80.

5. Страницы 35 и 36: мертиолят натрия в прописях ФСБ и ФБР приведен в виде брутто-формулы — не все читающие диссертацию смогут догадаться, что это за соединение.


Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования и носят рекомендательный характер. Результаты научных исследований автором апробированы, в должном объеме опубликованы в печати и в полной мере раскрывают тему диссертационной работы, которая соответствует специальностям 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных и 1.5.6. Биотехнология.

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

Диссертационная работа 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» является законченной научно-квалификационной работой, которая по своей актуальности, методическому обеспечению, новизне, научному и практическому значению, а также степени апробации соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 01.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786),

предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор, Селезнева Екатерина Валерьевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:  
кандидат биологических наук  
(03.02.03 - Микробиология,  
03.01.03 – Молекулярная биология),  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории микробиологии чумы  
отдела особо опасных инфекций  
Федерального бюджетного  
учреждения науки  
«Государственный научный центр  
прикладной микробиологии и  
биотехнологии»

  
Платонов Михаил Евгеньевич  
29 февраля 2024 г.

Подпись официального оппонента  
Платонова Михаила Евгеньевича  
заверяю:  
ученый секретарь ФБУН ГНЦ ПМБ  
доктор биологических наук



Коломбет Л.В.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279  
<https://www.obolensk.org>  
Тел.: +7 (4967) 36-00-03  
E-mail: [platonov@obolensk.org](mailto:platonov@obolensk.org), [platonovmichael@mail.ru](mailto:platonovmichael@mail.ru)