

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Мясоедова Юрия Михайловича** на тему: «Микобактериальные аллергены - совершенствование методов контроля качества и способов применения при аллергической диагностике туберкулёза и паратуберкулеза крупного рогатого скота», представленную в диссертационный совет 24.1.249.01 при ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности:
4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных.

Актуальность темы

Туберкулёз и паратуберкулёз крупного рогатого скота являются наиболее распространёнными микобактериальными инфекциями, которые приводят к снижению продуктивности, влияют на продовольственную безопасность, характеризуются значительными финансовыми затратами, кроме того туберкулёз представляет собой серьёзную проблему здравоохранения.

Туберкулёз крупного рогатого скота – заболевание, в отношении которого до настоящего времени не разработаны высокоэффективные терапевтические и профилактические средства. Поэтому, ключевым этапом, при осуществлении профилактических и оздоровительных мероприятий, является раннее выявление и санитарный убой инфицированных животных.

Интрадермальная туберкулиновая проба остается основным прижизненным скрининговым методом диагностики заболевания во всем мире, но имеет ряд недостатков, включая сниженную специфичность и чувствительность. Так, в благополучных и неблагополучных по туберкулёзу хозяйствах могут регистрироваться неспецифические реакции или же отсутствовать реакции у инфицированных животных в неблагополучных хозяйствах. При этом, в подавляющем числе случаев, причиной проявления реакции на внутрикожное введение туберкулина являются патогенные микобактерии туберкулёза, менее частой – нетуберкулёзные микобактерии характеризующиеся высокой степенью антигенной гомологии с микобактериями туберкулеза. В связи с этим разработка комплексного аллергена из нетуберкулёзных микобактерий, для дифференциации неспецифических реакций, является актуальной проблемой аллергической диагностики туберкулеза.

При паратуберкулезе животных также нет высокоэффективных методов диагностики, лечения и вакцинопрофилактики. Кроме того, сдерживающим звеном, в разработке способов диагностики

паратуберкулёзной инфекции, является отсутствие соответствующей лабораторной модели.

При аллергической диагностике паратуберкулёза различные авторы использовали либо ионин (паратуберкулин), изготовленный из микобактерий паратуберкулёза, либо туберкулины для птиц, изготовленные только из микобактерий туберкулеза птичьего вида. Вместе с тем, учитывая высокую видовую специфичность упомянутых аллергенов диагностическая ценность их не достаточна. Увеличение результативности дифференциальной аллергодиагностики может быть обусловлено использованием комплексного аллергена в состав, которого входят белковые фракции микобактерий птичьего вида, а также белковые производные других видов микобактерий, преимущественно сенсibiliзирующих животных, в условиях их содержания.

Для аллергической диагностики микобактериальных инфекций крупного рогатого скота используют различные виды аллергенов, качество которых имеет определяющее значение. Несмотря на длительность использования методик контроля их качества, некоторые проблемы до настоящего времени не решены. Так, не определены эквивалентность дозировок микобактериальных суспензий и доз микобактериальных аллергенов, не разработаны различные подходы нивелирования погрешностей, при изучении иммунобиологических характеристик туберкулинов. Не подобраны оптимальные режимы использования лабораторных моделей микобактериальных инфекций животных. При конструировании комплексных аллергенов не отработаны методические подходы оценки параметров качества, не решены вопросы моделирования паратуберкулёзной инфекции на лабораторных животных.

В этой связи диссертационное исследование Мясоедова Юрия Михайловича, направленное на разработку новых, высокоспецифичных комплексных аллергенов для диагностики туберкулеза и паратуберкулеза крупного рогатого скота и дифференциации неспецифических реакций, сравнительное изучение их свойств, совершенствование методических подходов при контроле параметров качества, способов и методов применения в практических условиях, в соответствии с современными Международными требованиями безусловно является важным и актуальным,

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

Сформулированные в диссертационной работе научные положения, выводы и практические предложения аргументированы и обоснованы. Автором проведён детальный обзор обширного литературного материала и на основании изученности основных проблем по теме диссертационного

исследования сформулирована четкая цель, отвечающая названию работы. Для реализации намеченной цели соискателем поставлены одиннадцать задач, четкие методические и методологические подходы при их решении дают полное представление об объёме исследований, намеченных для выполнения эксперимента. Методы, использованные автором в работе, специфичны, адекватны и отвечают современному научно-методическому уровню исследований. Выводы логически вытекают из результатов исследований.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность полученных Мясоедовым Ю.М. результатов работы не вызывает сомнений, определяется логически выстроенным планом исследования, направленным на решение поставленных задач, с использованием достаточного объема данных и комплекса современных методов.

Результаты диссертационного исследования отражены более чем в 60 печатных работах, 30 из них опубликованы в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК МОН РФ; в трёх методических документах, одном Межгосударственном ГОСТе; 11 патентах на изобретение, в том числе 2 свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ, 3 методических рекомендациях, 3 монографиях, что является подтверждением ценности и достоверности результатов исследований, полученных в ходе подготовки диссертационной работы. По материалам диссертационного исследования представлено 9 докладов на Международных научно-практических конференциях.

Новизна научных положений, выводов и рекомендации

Новизна представленных результатов обусловлена, в первую очередь, масштабностью исследования. Тщательно продуманный методологический подход к исследованию позволил автору не только выполнить намеченные задачи с конкретными результатами, но и выделить важнейшие элементы новизны, которые заключаются в следующем:

Разработаны оптимальные варианты сенсibilизации морских свинок микобактериями различных видов.

Предложены оптимальные дозировки микобактериальных аллергенов, использование которых позволит получить достоверные результаты при оценке их иммунобиологических параметров.

Определена оптимальная диагностическая доза ППД туберкулина для млекопитающих, в международных единицах *PPD-bovine*, при постановке биологической пробы на лабораторных животных.

Создана биологическая модель воспроизведения ГЗТ на различные виды микобактерий на сенсibilизированных морских свинках.

Впервые разработаны инструментальный способ оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов и программное обеспечение статистического расчета этих параметров.

Впервые изучена стабильность иммунобиологических параметров альттуберкулина Коха, туберкулина свободного от альбумоз, туберкулина на синтетической питательной среде концентрированного нагреванием, после периода длительного хранения, используемых ранее при диагностике туберкулёза животных.

Разработаны комплексные аллергены КАМ-2 и КАМ-3 для применения в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота и дифференциации неспецифических реакций и комплексный аллерген «Параавиум» для аллергической диагностики паратуберкулёзной инфекции крупного рогатого скота.

Ценность для науки и практики проведенной соискателем работы

Практическая значимость выполненной работы подтверждена патентами РФ: №110994, 05.05. 2011, «Шприц для введения животным суспензий лекарственных препаратов и антигенных субстанций»; №116472, 10. 01. 2012, «Пробка для укупорки стеклянных контейнеров, используемых в микробиологии»; №2517218, 25.10.2012, «Способ моделирования гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок на микобактерии *M. bovis*»; Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014611927, 26.12.2013, *Specificity 1.0*; Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2013617658, 20.05.2013, *Bioactive 1.0*; №140669, 09. 01.2014, «Устройство определения морфологических количественных параметров воспалительного процесса, протекающего в коже лабораторных животных»; №2657837, 29. 09. 2017, «Способ выявления анергичного, больного туберкулезом крупного рогатого скота». Разработка награждена Золотой медалью Российской агропромышленной выставки «Золотая осень 2018»; №2691398, 07 08 2018, «Способ оценки сенсibilизирующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов»; № 2715220, 13.11.2019, «Способ оценки сенсibilизирующих свойств атипичных микобактерий»; №2771778, 20. 07. 2021, «Комплексный аллерген для диагностики паратуберкулёза». Разработка награждена Золотой медалью Российской агропромышленной выставки «Золотая осень 2022»; № 2800320, 20. 06. 2022, «Способ дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий на сенсibilизированных этими видами микобактерий морских свинок».

Соответствие диссертационной работы и автореферата критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней»

Диссертационная работа Мясоедова Юрия Михайловича обладает внутренним единством и логикой, содержит новые научные и практические данные, имеющие важное значение для ветеринарной медицины. При выполнении экспериментов автором использованы современные клинические, бактериологические, биотехнологические, иммунологические и математические методы.

Исследования по диагностике туберкулеза и паратуберкулёза проведены в соответствии с нормативными документами: «Наставление по диагностике туберкулёза животных» от 2002 года и «Наставление по диагностике паратуберкулёза (паратуберкулезного энтерита) животных» от 2001 года.

Автореферат написан по традиционной схеме, и в достаточном объёме отражает основное содержание диссертационной работы.

Опубликованные работы свидетельствуют о существенном личном вкладе диссертанта в решение поставленных задач.

Оценка содержания работы, её завершенности

Диссертационное исследование Мясоедова Ю.М. изложено на 277 страницах машинописного текста по традиционному плану и включает 45 таблиц, 10 иллюстраций и состоит из следующих разделов: оглавление, введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты исследований, обсуждение полученных результатов исследований, заключение, выводы, практическое использование результатов исследований, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список использованной литературы, приложения. Библиографический указатель включает 411 источников до 2022 года включительно, из них 239 отечественных и 172- зарубежных авторов.

Во введении автор показывает актуальность проблемы, степень разработанности темы, формулирует цель, задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Материалы и методы изложены достаточно четко, что позволяет объективно оценить объём и глубину исследования. Приведены сведения о личном вкладе автора, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность полученных результатов и приведены данные апробации результатов исследования.

Глава «Обзор литературы» написана правильным литературным языком, содержит все элементы, необходимые для обоснования основных аспектов настоящего исследования. Диссертант анализирует отечественные и

зарубежные работы, касающиеся следующих вопросов: истории открытия и совершенствования технологии получения микобактериальных аллергенов; аллергической диагностики микобактериальных инфекций; проблем появления неспецифических реакций при диагностике туберкулёза крупного рогатого скота, а также вопросов совершенствования дифференциальной аллергической диагностики; вопросов диагностики паратуберкулёза крупного рогатого скота.

В главе «Результаты исследований» автором определены оптимальные варианты сенсibilизации морских свинок микобактериями разных видов, выявлена предпочтительность использования живых микобактерий и определена минимальная дозировка, обеспечивающая длительное сохранение гиперчувствительности замедленного типа при максимальной интенсивности.

Далее определены оптимальные эквивалентные дозировки микобактериальных аллергенов и указан их приемлемый диапазон, как для оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, так и для осуществления различных экспериментальных исследований.

Также автором исследования продемонстрирована предпочтительность лабораторной модели – сенсibilизированных морских свинок, в сравнении с инфицированным крупным рогатым скотом, для определения параметров туберкулиновых аллергенов.

Предложен подход к формированию групп морских свинок, для оценки параметров туберкулинов. Также определены оптимальные параметры учета туберкулиновой реакции и кратность использования сенсibilизированных морских свинок.

Автором исследования проведена работа по определению в Международных (используемых в настоящее время) единицах активности диагностической дозы туберкулина для млекопитающих для оценки развития туберкулёзного процесса у морских свинок.

Проведены исследования иммунных механизмов, при развитии туберкулиновой аллергии.

Для снижения различных видов погрешностей, регистрируемых при оценке иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, автором разработан и апробирован инструментальный подход для оценки интенсивности туберкулиновой реакции, а также предложено программное обеспечение.

Диссертантом осуществлены исследования, связанные с разработкой новых комплексных аллергенов для дифференциальной диагностики

туберкулёза и паратуберкулёза. Проведены комплексные исследования новых аллергенов и оценена их стабильность.

В соответствии с Международными требованиями, усовершенствованы методики оценки активности и специфичности бивалентного варианта аллергена КАМ.

Логичным завершением работы является заключение, которое представляет собой анализ полученных данных и сопоставление их с результатами других исследователей, что позволяет подтвердить обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Практические предложения и перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования представляются ценными для теоретического и практического применения в ветеринарной медицине.

По диссертационной работе принципиальных замечаний нет, при этом хотелось бы получить ответы на некоторые вопросы.

1. Известно, что первоначально туберкулин изготавливали с использованием нескольких штаммов микобактерий туберкулёза, по каким причинам его изготовление в настоящее время осуществляется с использованием одного штамма?

2. В своей диссертационной работе вы разработали новые комплексные аллергены КАМ-2 и КАМ-3 из нескольких видов нетуберкулезных микобактерий (НТМБ). Почему именно эти виды вы использовали и изучали ли вы сенсibiliзирующие свойства других видов НТМБ?

3. Какими стандартно используемыми методиками возможно определить вид туберкулина (например, при отсутствии на флаконе этикетки)?

4. В своей работе вы описываете использование культуральной жидкости (КЖ) поясните, как получали КЖ и возможно ли ее получение другими способами?

Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Диссертационная работа Мясоедова Ю.М. на тему: «Микобактериальные аллергены - совершенствование методов контроля качества и способов применения при аллергической диагностике туберкулёза и паратуберкулеза крупного рогатого скота», представленная в диссертационный совет 24.1.249.01, созданный 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 4.2.3. – инфекционные болезни и иммунология животных, является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей решение важных теоретических и прикладных задач, связанных с совершенствованием аллергической диагностики туберкулёза и паратуберкулёза крупного рогатого скота, имеющая существенное значение для ветеринарной науки и практики. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Мясоедова Юрия Михайловича 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. 2013г. (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации 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 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук, по специальности: 4.2.3. – инфекционные болезни и иммунология животных.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (107076, Москва, ул. Стромынка, д.10, Тел.: +7 (916) 688-98-25, e-mail: makarova75@yandex.ru)

Доктор биологических наук

Макарова Марина Витальевна

Подпись М.В. Макаровой заверяю:

Ученый секретарь Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (107076, Москва, ул. Стромынка, д.10, Тел.: +7 (499) 268-00-05, e-mail: cbt@zdrav.mos.ru)

Доктор медицинских наук



Иванова Диана Александровна