

«Утверждаю»

Директор ФГБНУ «НИИПЗК»

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН.

Г.Ю. Косовский

«27» февраля 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева» (ФГБНУ НИИПЗК) на диссертацию **Екатерины Валерьевны Селезневой**, выполненную 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», 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. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ГБК) – высоконтагиозное заболевание, отличающееся быстрым течением и высокой смертностью. Инфекция наносит значительный экономический ущерб кролиководческим фермерским и личным подсобным хозяйствам, поскольку по действующим ветеринарным правилам все кролики в неблагополучном хозяйстве подлежат немедленному убою. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус (ВГБК) рода *Lagovirus* семейства *Caliciviridae*, относящийся к одной из геногрупп лаговирюсов GI.1 (ВГБК-1) или GI.2 (ВГБК-2). Наиболее эффективным способом снизить риск зараже-

ния животных вирусом является вакцинация, которую проводят в шестинедельном возрасте, затем – спустя 3 месяца, далее – один раз в полгода. В настоящее время наиболее значимую роль в этиологии болезни приобрел ВГБК-2. С момента его обнаружения в 2010 году во Франции он замещает ВГБК-1 по всему миру. При этом вакцины, изготовленные на основе штаммов ВГБК-1, не защищают кроликов от заражения ВГБК-2.

Для диагностики ГБК используют методы детекции вирусной РНК в печени и крови, включающие в себя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией и секвенирование генов; вирусные антигены можно выявить методом иммуноферментного анализа (ИФА). С помощью ИФА можно обнаружить антитела в организме переболевших кроликов в течение продолжительного времени. Вместе с тем существует проблема изготовления диагностических препаратов и вакцин, поскольку лаговирuсы не реплицируются в культурах клеток, что затрудняет использование инфицированного патологического материала, полученного от зараженных кроликов.

Поэтому диссертация Селезневой Е.В., целью которой являлась разработка тест-систем на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 для иммунодиагностики вирусной геморрагической болезни кроликов является актуальной и имеет большое научное и практическое значение.

Для реализации поставленной цели диссертантом были сформулированы следующие задачи:

- определить полную нуклеотидную последовательность и провести филогенетический анализ генома вируса генотипа ВГБК-2 (штамм «Тула»).

- разработать технологию получения рекомбинантных главных капсидных белков VP60 (recVP60) вируса ГБК генотипов GI.1 (ВГБК-1) и GI.2 (ВГБК-2) в бакуловирuсной системе экспрессии генов и охарактеризовать полученные продукты.

- изучить антигенные и иммуногенные свойства полученных recVP60 для кроликов.

- разработать тест-систему (АГ-ВГБК) на основе гесVP60 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в формате непрямого ИФА для обнаружения антител к вирусу ГБК.

- оценить возможность применения разработанной тест-системы (АГ-ВГБК) для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу ГБК у кроликов.

- разработать тест-систему (АГ-ВГБК) в формате сэндвич-ИФА для выявления антигена вируса ГБК на основе использования моноклиальных антител к основному капсидному белку VP60 вируса ГБК.

- оценить возможность применения разработанной тест-системы (АГ-ВГБК) для выявления вируса ГБК в патологическом материале и для определения концентрации гесVP60 в образцах культуральной жидкости в процессе получения гесVP60.

Научная новизна исследований. В ходе клинико-эпизоотологических исследований кролиководческого хозяйства от погибших животных был выделен новый вирулентный штамм «Тула» генотипа ВГБК-2, определена его полная нуклеотидная последовательность и проведен филогенетический анализ генома.

Впервые получены рекомбинантные капсидные белки ВГБК-1 и ВГБК-2 (гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2) и показана их способность к самосборке в вирусоподобные частицы *in vitro*. На восприимчивой модели животных (кролики) изучены антигенные и иммуногенные свойства полученных рекомбинантных белков, установлена возможность их применения в качестве специфических реагентов для ИФА тест-систем, предназначенных для выявления антител к ВГБК-1 и ВГБК-2 в сыворотке крови и соответствующих вирусных антигенов в биологическом материале. Автор разработал и показал практическую эффективность непрямого ИФА для выявления вирусоспецифических антител с 98%-ной чувствительностью и 96,6%-ной специфичностью по сравнению с зарубежным аналогом и «сэндвич-ИФА» для обнаружения антигенов ВГБК с аналитической чувствительностью 20 нг/мл.

Доказаны иммуногенная доза рекомбинантных белков (50 мкг) и значение защитного титра антител к ВГБК (1:400 в ИФА и 1:640 в РТГА) у иммунизированных кроликов.

Практическая значимость работы заключается в получении и практическом применении новых иммунобиологических реагентов – рекомбинантных белков и моноклональных антител для разработки эффективных иммуноферментных тест-систем, предназначенных для диагностики ГБК, вызванной различными генотипами вируса. Автором разработан Стандарт организации (СТО) 00496165-0002-2021 «Набор для иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу геморрагической болезни кроликов в сыворотке крови», утвержденный директором ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, член-корр. РАН А.М. Гулюкиным 30.11.2021 г. Автором также разработаны Методические указания (МУК) «Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в патологическом материале методом сэндвич-ИФА», утвержденные руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН В.В.Калашниковым 15.03.2022 г.

Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать разработанные иммуноферментные тест-системы к использованию в диагностических целях, а полученные рекомбинантные белки (recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2) для создания эффективных средств специфической профилактики ГБК.

Апробация результатов исследования и публикация работ. Результаты исследований доложены и обсуждены на V Международной конференции AGRITECH V-2021, научно-производственных совещаниях ООО «Ветбиохим», АНО «НИИ ДПБ» (2019-2023 гг.), межлабораторном совещании сотрудников ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (2023 г.). По материалам диссертации соискателем опубликованы 5 научных работ, в том числе 3 работы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 работа в журнале, индексируемом в базе SCOPUS.

Содержание работы. Диссертационная работа Е.В. Селезневой изложена на 115 стр. компьютерного текста, логически структурирована и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, описание 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, 180 из которых являются зарубежными авторами.

В разделе «Введение» обоснована актуальность выбранной темы исследований, поставлена цель, сформулированы семь задач для ее реализации, описаны методология, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследований, а также описана степень достоверности и апробация результатов проведенных исследований.

Раздел «Обзор литературы» начинается с характеристики вирусной геморрагической болезни и ее возбудителя. Описаны эпизоотологические данные, где докладывается о распространении вирусов ГБК 1-го и 2-го генотипов. Далее диссертант повествует о патогенезе, клинических признаках, патологоанатомической картине, методах лабораторной диагностики, иммунитете и специфической профилактике, где описывает отрицательные характеристики тканевых вакцин и перспективные препараты для специфической профилактики ВГБК в виде генноинженерных вакцин.

Далее Е.В. Селезнева в полном объеме описывает материалы и методы исследований.

В разделе «Результаты собственных исследований» автором приведены результаты собственных исследований, касающиеся определения полной нуклеотидной последовательности генома и проведения филогенетического анализа штамма «Тула» генотипа ВГБК-2. Получены recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2. Следующим этапом было изучение антигенной активности полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 и оценка их антигенного родства между собой и с ВГБК-1 и ВГБК-2 в РТГА. Затем автор определял корреля-

ционную взаимосвязь между результатами ИФА и РТГА при выявлении специфических антител к главному капсидному белку вируса ГБК. Одним из важных этапов диссертационной работы было определение иммуногенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в отношении ВГБК-1 и ВГБК-2. На основе полученных рекомбинантных белков Е.В. Селезневой были разработаны тест-системы, предназначенные для выявления антител к вирусу ГБК и для выявления recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости (производственное назначение) и ВГБК генотипов GI.1 и GI.2 в патологическом материале (диагностика).

В целом, научные положения, итоги выполненного исследования, рекомендации и практические выводы вытекают из результатов исследований, их достоверность не вызывает сомнений. Диссертационная работа соответствует заявленным специальностям, текст автореферата отражает основное содержание диссертации.

Вопросы и замечания.

1. В обзоре литературы (с.22) отмечено, что «ПЦР обладает высокой чувствительностью (>105 раз чувствительнее ИФА), удобна в использовании, позволяет быстро получить результаты» Однако, через абзац автор пишет, что «Наиболее перспективным методом лабораторной диагностики ВГБК является ... ИФА ИФА высокоспецифичный и чувствительный метод ...» Возникает вопрос: какой из двух методов диагностики, ПЦР или ИФА, по мнению автора, наиболее чувствителен и перспективен?
2. Нет объяснения, почему recVP60-1 и recVP60-2 на иммуноблоттинге (рис.9, стр. 48) идут двумя полосами, и почему верхняя полоса показывает молекулярную массу больше у recVP60-2, чем у recVP60-1.
3. В работе отмечается недостаточно полное и развернутое описание результатов: таблицы 2-6 (стр.50-55), разделы 4.4 и 4.6; а на рис. 16-18 не полное разъяснение обозначений. В разделе 4.10, таблица 10: не подсчитана досто-

верность разницы между группами для контрольного метода ИФА (INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1) и разрабатываемого (АТ-ВГБК); таблица же 12 не информативна без контроля посредством референтной ИФА (INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1). В разделе 4.11 нет пояснения, для чего проводилось титрование рекомбинантных капсидных белков (рис.20) и как применены результаты рис.21 для разработки сэндвич-ИФА. Нет ясного пояснения к рис.22 и нет описания результатов этого рисунка.

4. Для раздела 4.8: пожелание: хотелось бы, чтобы было проведено сопоставление между разной иммуногенной активностью recVP60-1 и recVP60-2 при заражении разными вирусными штаммами ГБК («Воронежский-87» и «Тулеский») и результатом их (recVP60-1 и recVP60-2) разной проявленности на иммуноблоте (рис.9, стр. 48), о чем отмечено в п.2 данных замечаний.

5. В списке сокращений отсутствует расшифровка аббревиатуры ГБК. Некоторые сокращения расшифрованы и в тексте и в списке сокращений, но не все, что затрудняет чтение работы.

6. Хотелось бы, чтобы в списке литературы было представлено больше отечественных авторов.

Заданные вопросы и сделанные замечания не снижают научную и практическую ценность исследования, выполненного на современном научно-методическом уровне, представляющем собой завершённый научно-квалификационный труд, содержащий решение научно-практической задачи.

Заключение. На основании анализа материалов, изложенных в диссертационной работе, можно констатировать, что диссертация **Екатерины Валерьевны Селезневой** «Разработка тест-систем для иммунодиагностики вирусной геморрагической болезни кроликов на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2» является самостоятельной, завершённой научно-квалификационной работой, в которой

изложены новые научно обоснованные решения и разработки, имеющие существенное значение для развития кролиководства страны.

Материалы диссертации по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций в научных печатных изданиях соответствуют требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с «Положением о присуждении ученых степеней» ВАК РФ (утвержденным постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.). Автор работы, **Екатерины Валерьевны Селезнева**, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальностям 4.2.3 - Инфекционные болезни и иммунология животных и 1.5.6. - Биотехнология.

Отзыв подготовлен: кандидатом биологических наук Ириной Михайловной Зыряновой (заведующей отделом биотехнологии, ФГБНУ НИИПЗК).

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании методической комиссии по вопросам селекции, разведения, кормления и ветеринарной защиты пушных зверей и кроликов (протокол № 7 от 26.02. 2024 г).

Заведующий отделом биотехнологии

ФГБНУ НИИПЗК

Инспектор по кадрам

ФГБНУ НИИПЗК



к.б.н. И.М. Зырянова

О.Е. Блохнова