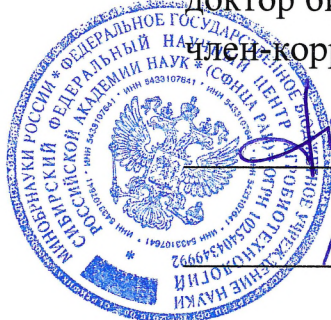


«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Сибирского  
федерального научного центра  
агробиотехнологий Российской академии наук,  
доктор биологических наук, профессор РАН,  
член-корреспондент РАО



\_\_\_\_\_ К.С. Голохваст

18 мая 2022 г.

**ОТЗЫВ**

ведущей организации ФГБУН Федерального научного центра агробиотехнологий РАН, на диссертационную работу Веретенникова Владислава Валерьевича «Разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни», представленную в диссертационный совет Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный университет ветеринарной медицины» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Актуальность темы диссертации.** Последние десятилетия птицеводство в Российской Федерации является важнейшим источником пищевого сырья животного происхождения для населения. Тем не менее, существует ряд проблем, которые способны повышать снижать эффективность этой отрасли сельского хозяйства. На ограниченной территории крупных птицефабрик происходит сосредоточение большого поголовья разновозрастных групп птицы и постоянный приток новых

партий суточного молодняка, создает риск возникновения эпизоотий ряда вирусных и бактериальных инфекций.

Вирус болезни Гамборо (инфекционной бурсальной болезни) характеризуется довольно существенной устойчивостью в объектах окружающей среды и, в то же время, существенным генетическим разнообразием. Высокая контагиозность инфекции и неодинаковая эффективность различных вакцин, в отношении разных штаммов этого вируса являются важными факторами позволяющими наносить этой инфекции существенный экономический ущерб.

Несмотря на то, что проблема болезни Гамборо остается актуальной многие десятилетия, современная наука и биотехнология не только не смогли решить эту проблему окончательно, но имеет место тенденция появления новых штаммов вирусов, дальнейшее укрупнение птицефабрик также способствует ухудшению эпизоотической ситуации.

Так как вирус вызывает серьезную иммуносупрессию, то и противодействие этой инфекции означает повышение эпизоотического благополучия птицефабрики в отношении широкого спектра инфекций, в долгосрочной перспективе.

Помимо необходимости импортозамещения, создание новых вакцин, содержащих протективные антигены эпизоотически значимых, для нашей страны штаммов, имеет огромное значение в контексте упомянутых выше проблем.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Диссертантом проведен анализ литературы по проблеме вакцинопрофилактики инфекционной бурсальной болезни, на основании которого были определены цель и задачи исследований. Научные положения, выводы и практические предложения, сформулированные в диссертационной работе Веретенникова Владислава Валерьевича, соответствуют поставленным цели и задачам, обоснованы фактическим материалом, включающим большой

объем экспериментальных исследований с применением методик, соответствующих современному уровню развития науки. Сравнительный анализ антигенной структуры гена VP2 различных штаммов возбудителей инфекционной бурсальной болезни, генноинженерные работы и изучение антигенной активности рекомбинантного белка VP2, были проведены на высоком методическом уровне.

**Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.** Работа выполнена за период с 2018 - 2020 гг. на базе кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации., по гранту, предоставляемым ФГБОУ ВО СПбГУ на тему: «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адъювантов – иммуностимуляторов». Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как исследования проведены на большом фактическом материале с использованием современных методов исследований, статистически обработаны и испытаны в производственных условиях. Результаты исследований представлены в таблицах и рисунках. Материалы диссертации отражены в 8 научных работах, из них 2 – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на на 73-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГАВМ, (Санкт-Петербург, 2019); XX Международной конференции Российского отделения Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству", (Сергиев Посад, 2020); национальной научной конференции профессорско-

преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, (Санкт-Петербург, 2021); X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», (Санкт-Петербург, 2021).

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые разработана отечественная рекомбинантная вакцина нового поколения на основе белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни эпизоотического штамма, выделенного на территории Российской Федерации. В ходе работы с эпизоотическим штаммом «Синявинский» вируса ИББ, последовательность гена белка VP2 которого была использована для создания рекомбинантной вакцины, подобраны праймеры. При филогенетическом анализе данного штамма в сравнении с эталонными и высоковирулентными штаммами было установлено, что эпизоотический штамм вируса ИББ «Синявинский» более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ, чем к другим классическим штаммам Cu-1, Ga-1, D78, STC и 23/82.

Экспериментальным путем, в условиях вивария, доказана безвредность и антигенная активность экспериментальных серий рекомбинантной вакцины против ИББ. Кроме того, определена стерильность данной вакцины. Действие данной вакцины на организм птицы было исследовано с применением комплекса серологических, вирусологических, микробиологических и молекулярно-генетических методов.

**Значимость для науки и практики проведенной соискателем работы** Впервые на территории Российской Федерации синтезирован рекомбинантный белок VP2 вируса ИББ на дрожжах *Pichia pastoris*. Разработан алгоритм получения рекомбинантного белка, так как в отечественной ветеринарной науке практически отсутствует понимание

работы экспрессионных систем на основе *P. pastoris* и производства рекомбинантных белков вируса ИББ. Важное практическое значение имеет выбор нуклеотидной последовательности белка, на основе котором основана рекомбинантная вакцина, так филогенетический анализ штаммов вируса ИББ, из разных регионов, показывает существенные различия при их сравнении. Поэтому доказано, что для производства и применения рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни, на основе белка VP2, лучше использовать штаммы, выделенные на территории Российской Федерации

Так как существует множество проблем при выращивании промышленных птиц, с которыми сталкиваются производители при использовании живых вакцин в связи с их остаточным иммуносупрессивным действием. Применение рекомбинантной вакцины является безвредным и не ведет к иммунодепрессивному состоянию птиц.

Сегодня российское животноводство зависит от импортных ветпрепаратов и вакцин: 85% иммунобиологических лекарств, которые используются в российском животноводстве, – импортные. Поэтому разработка и производство отечественных вакцин на территории Российской Федерации обеспечивает пищевую и биологическую безопасность нашей страны.

**Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению диссертации.** Диссертационная работа Веретенникова В.В. изложена на 114 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; собственные исследования, включающие материалы и методы, результаты исследований; обсуждение результатов; выводы; практические предложения; перспективы дальнейшей разработки; список использованных сокращений; список использованной литературы; приложение. Диссертация иллюстрирована 3 таблицами, 13 рисунками, которые наглядно отражают результаты

проведенных исследований. Список литературы включает 174 источник, из которых 130 - зарубежные.

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследований, показаны новизна, теоретическая и практическая значимость работы, из которых логически вытекают положения, выносимые на защиту. В разделе также отражены методология и методы исследований, степень достоверности и апробация результатов, личное участие соискателя, публикации результатов исследований и структура диссертации.

Раздел «Обзор литературы» содержит сведения об эпизоотической ситуации, распространении инфекционной бурсальной болезни, молекулярно-биологических особенностях вируса, патогенезе данного заболевания

В разделе изложены аспекты иммунопрофилактики и диагностики. Обзор литературы имеет заключение и в целом отражает современное состояние проблемы. Изучение и анализ сведений, представленных в литературных источниках отечественных и зарубежных исследователей, позволили автору диссертационной работы обосновать актуальность, новизну работы, ее цель и задачи.

Глава «Собственные исследования» включает разделы «Материалы и методы исследований» и «Результаты собственных исследований».

В разделе 2.1. «Материалы и методы исследований» описаны объекты исследований, перечислены используемые в процессе проведения исследований среды, растворы, реактивы и пр. материалы, оборудование и приборы. В разделе дано краткое описание методов и методик исследований, которые позволяют получать в ходе исследований достоверные результаты.

В разделе 2.2. «Результаты собственных исследований» изложены ход проведения и результаты исследований, проведенных соискателем. Результаты исследований представлены в соответствии с целью работы и поставленными задачами, иллюстрированы 3 таблицами, 11 рисунками. Раздел разделен на 6 основных подразделов.

В подразделе 2.2.1. «Конструирование плазмид, содержащих ген VP2» представлены данные о структуре плазмидных векторов, праймеров для амплификации и клонирования, целевом гене VP2. Также описаны однонуклеотидные замены (синонимические и несинонимические) у изучаемого эпизоотического штамма вируса ИББ.

В подразделе 2.2.2. «Получение штамма дрожжей *P. pastoris*, синтезирующего белок VP2» Описана интеграция в геном рекомбинантного гена VP2 и результаты скрининга штаммов-продуцентов подвергнутых электропорации

Подраздел 2.2.3. «Синтеза белка VP2 в дрожжах *P. pastoris*» посвящен вопросу эффективности синтеза рекомбинантного антигена по данным вестерн-блоттинга. Описаны особенности подготовки образцов для тестирования.

Подраздел 2.2.4 «Изучение антигенных свойств рекомбинантной вакцины» содержит информацию о экспериментах по проверке иммуногенности вакцины. В разделе приведены данные ИФА анализа (с использованием разных ИФА-тестов) цыплят иммунизированных рекомбинантным антигеном, в различных концентрациях.

Подраздел 2.2.5 посвящен вопросу изучения таких характеристик вакцины как стерильность

Подраздел 2.2.6 также описывает результаты изучения безвредности

В главе 3. «Обсуждение результатов исследований» проведен сравнительный анализ литературных данных и результатов исследований, полученных в ходе проведения работы.

В главе 4 подведены итоги проведенной работы, которые представлены в виде выводов и практических предложений. Выводы вытекают из поставленных задач и соответствуют тематике диссертационной работы. В выводах отражены основные результаты проведенных исследований, на основе которых сформулированы практические предложения.

Диссертационная работа завершена списком сокращений, списком использованной литературы, благодарностями, предложениями по дальнейшей

разработке и приложением. В Приложении представлены документы, подтверждающие разработку и ее внедрение (копия комиссионных испытаний вакцины). Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертационной работы.

### **Замечания, вопросы и предложения по диссертации.**

При общей положительной оценке работы Веретенникова Владислава Валерьевича имеются некоторые замечания и вопросы, на которые хотелось бы получить ответы и разъяснения:

1. В разделе 2.2.1 описано молекулярно-генетическое исследование штамма «Синявинский» в сравнении с другими эпизоотически значимыми штаммами вируса ИББ, однако, данные о сравнении с используемыми в Российской Федерации, вакцинными штаммами практически отсутствуют. В связи с этим просьба уточнить – в чем именно заключаются молекулярно-генетические различия гена VP2 между штаммом «Синявинский» и вакцинными штаммами?
2. При сравнении гена VP2 (GenBank: KJ699103.1) с аналогичным геном штамма «Синявинский» вами обнаружена одна синонимичная замена. В какой позиции локализовалась эта замена и затрагивала ли она поверхностные эпитопы белка VP2? Какова вероятность влияния несинонимических замен на функциональные свойства вируса (например, при изменении в сайтах связывания RdRp)?
3. В результатах собственных исследований широко используются жаргонизмы и англицизмы типа Labber, «компетенты» и др. .
4. Как вы оцениваете вероятность заниженных результатов в ИФА при иммунизации Вашим рекомбинантным антигеном, учитывая различия аминокислотных последовательностей
5. Так как риски нейтрализации вашего вакцинного препарата трансвариальными антителами, видимо отсутствуют, то каковы перспективы использования данной вакцины на суточных цыплятах и в



инкубаторе? Есть ли смысл в дальнейшем сочетать такую вакцинацию с живыми вакцинными штаммами и если да, то какими?

6. Почему вы не остановились на клонировании антигена в системе кишечной палочки и насколько полезно гликозилирование рекомбинантного VP2 в культуре дрожжей для иммуногенности антигена, на ваш взгляд? Насколько известно, *Pichia* характеризуется добавлением к GlcNAc рекомбинантных белков маннозных цепей (их структура в целом похожа для млекопитающих и птиц) и довольно длинных бетта-маннозных цепей (их структура отличается довольно существенно).

7. Как вы нормируете содержание рекомбинантного антигена в вакцине, его чистоту, отсутствие агрегатов?

Указанные замечания и вопросы не отражаются на общей положительной оценке работы, они связаны с интересом к данной проблеме и носят дискуссионный характер.

### **Заключение**

Диссертационная работа Веретенникова Владислава Валерьевича «Разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для промышленного птицеводства, вакцинопрофилактики экономически-значимой болезни. Работа выполнена на актуальную тему лично автором на высоком научном уровне и на достаточном для обобщения и выводов материале, полученном с использованием современных методов исследований. Считаю, что по актуальности, новизне исследований, научной и практической значимости диссертационная работа отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. от 01.10.2018), а ее автор Веретенников Владислав Валерьевич заслуживает ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная

