



Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный центр охраны здоровья животных»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец,  
т.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru  
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

*19.05.2022 № 01-04/4538*

**ОТЗЫВ**

официального оппонента, доктора ветеринарных наук, доцента Ирзы Виктора Николаевича на диссертационную работу Веретенникова Владислава Валерьевича на тему «Разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни», представленную к защите 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

**1. Актуальность темы диссертации.**

Одним из актуальных вирусных заболеваний, способных наносить серьезный экономический ущерб промышленному птицеводству, является инфекционная бурсальная болезнь (б. Гамборо, ИББ). ИББ относится к наиболее значимым иммунодепрессивным инфекциям. У заболевших птиц отмечается повышенная восприимчивость к возбудителям инфекционных болезней различной этиологии и снижение эффективности вакцинопрофилактики других болезней. Б. Гамборо распространена во всех странах, включая Российскую Федерацию. Защита поголовья от циркулирующих высоковирулентных вирусов обеспечивается только плановой вакцинацией. В настоящее время для специфической профилактики

ИББ используют живые, инактивированные и векторные вакцины. Традиционные живые вирусные вакцины обладают выраженной эффективностью в отношении защиты от ИББ, но, так или иначе, вызывают изменения в основном иммунокомпетентном органе птиц – бурсе, что влечет за собой возможность развития иммуносупрессии. В связи с этим возрастает интерес к вакцинам нового поколения: векторным, рекомбинантным и иммунокомплексным. Рекомбинантные вакцины производят на основе белка VP2 вируса ИББ, который отвечает за формирование защитного иммунного ответа. Такие вакцины предотвращают развитие иммунодепрессивных состояний, значительно снижают уровень проявления вторичных инфекций и, как следствие, резко снижают или исключают применение антибиотиков.

В.В. Веретенниковым представлен вариант данной рекомбинантной вакцины, впервые изготовленной в Российской Федерации на основе отечественного штамма. Поэтому избранная соискателем тема диссертации является актуальной.

## **2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Диссертантом проведен всесторонний анализ литературы по изучаемой проблеме, позволивший четко сформулировать цель и задачи исследований. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертации В.В. Веретенникова, подтверждается результатами собственных исследований автора, проведенных на высоком методическом уровне с использованием современных генноинженерных подходов.

## **3. Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.**

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ Министерства сельского хозяйства РФ период с 2018 по 2021гг. в рамках научно-исследовательской программы: «Создание нового поколения

вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адъювантов – иммуностимуляторов». Исследования проведены с использованием как классических методов (вирусологический, серологический), так и инновационных современных методов (молекулярно-генетический, биоинформационный). Результаты исследований статистически обработаны с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel, ClustalW и MEGA 11, их достоверность также подтверждена комиссионными испытаниями и апробацией на нескольких конференциях.

Материалы исследований были представлены на X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», Санкт-Петербург, 2021; Национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2021; XX Международной конференции Российского отделения Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству", Сергиев Посад, 2020; 73-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 2019.

Научная новизна заключается в том, что впервые в РФ разработана рекомбинантная вакцина нового поколения на основе отечественного эпизоотического штамма «Синявинский», которая вызывает выработку защитного иммунного ответа у цыплят. Изучена нуклеотидная последовательность штамма вируса ИББ «Синявинский», кодирующая рекомбинантный оболочечный гликопротеин вируса (VP2), и сравнена с последовательностями высоковирулентных российских и классических штаммов. Разработан алгоритм производства рекомбинантного белка VP2 вируса ИББ в дрожжевой системе *Pichia pastoris*.

**4. Значимость для науки и практики проведенной соискателем работы.** В настоящее время в отечественном птицеводстве применяются в основном

живые, инактивированные и векторные вакцины импортного производства. Технология производства рекомбинантных вакцин не отработана. Поэтому разработка рекомбинантной вакцины на основе белка VP2 высоковирулентного отечественного штамма вируса ИББ представляет большой научный и практический интерес, в том числе, в плане сокращения зависимости российского птицеводства от зарубежных поставок. Также, на сегодняшний день в отечественной ветеринарной медицине практически отсутствует понимание работы экспрессионных систем на основе *P. pastoris* и производства рекомбинантных белков вируса ИББ. Выбор нуклеотидной последовательности с экспрессией белка, на основе которого будет основана рекомбинантная вакцина, заслуживает особого внимания, так как, по мнению многих авторов, филогенетический анализ штаммов вируса из разных регионов показывает существенные различия при их сравнении.

#### **5. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению диссертации.**

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 3 таблицами. Список литературы включает 174 источника, в том числе 130- иностранных.

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, обозначена степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследований, из которых логически вытекают положения, выносимые на защиту. В данном разделе также отражены степень достоверности и апробация результатов, публикации по теме диссертации и структура диссертации.

Раздел «Обзор литературы» содержит современные сведения об инфекционной бурсальной болезни и ее распространении. Дана характеристика вируса ИББ, рассмотрена классификация вакцин против ИББ, представлено описание мейлотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, подробно

изложен механизм трансформации бактериальных и дрожжевых клеток для последующего синтеза рекомбинантного белка. Анализ научной литературы по изучаемой проблеме позволил автору обосновать актуальность работы, ее цели и задачи.

Глава «Собственные исследования» включает разделы «Материалы и методы исследований» и «Результаты собственных исследований». В разделе «Материалы и методы» изложен алгоритм создания рекомбинантной вакцины, схема эксперимента на цыплятах, приведено описание современных методик, использованных автором в процессе выполнения диссертации и подтверждающих ее высокий методический уровень.

В разделе 2.2 «Результаты собственных исследований» изложены этапы и результаты исследований в соответствии с целью работы и поставленными задачами. Раздел иллюстрирован 2 таблицами и 11 рисунками, содержит 6 подразделов.

В подразделе 2.2.1 «Конструирование плазмид, содержащих ген VP2» автор изложил ход получения плазмид, содержащих ген VP2, начиная от выделения РНК возбудителя, синтеза кДНК методом обратной транскрипции (ОТ) и заканчивая подбором праймеров для встраивания в плазмиду pAL2-T. На каждом этапе автор проверяет наличие вставки методом ПЦР с детекцией в агарозном геле и иллюстрирует это. В этом же подразделе автор анализирует нуклеотидную последовательность гена VP2 штамма «Синявинский» вируса ИББ, используя Сэнгеровское секвенирование с праймерами M13. Для сравнения этого штамма с другими проведен филогенетический анализ с построением дендрограммы. Необходимо отметить, что плазида pAL2-T была промежуточным вектором и далее нуклеотидная последовательность была встроена в другую плазмиду (pPICZ $\alpha$ -A), необходимую для трансформации дрожжей.

В подразделе 2.2.2 «Получение штамма дрожжей *P. pastoris*, синтезирующего белок VP2», изложен ход трансформации дрожжей плазмидой pPICZ $\alpha$ -VP2.

Для этого автор сначала линеаризовал плазмиду с помощью рестриктазы PmeI, а затем трансформировал штамм *P. pastoris* GS115. Наличие необходимой интеграции проверяли с помощью ПЦР с парой праймеров VP2-EcoRI-F – VP2-XbaI-R.

В подразделе 2.2.3 «Синтез белка VP2 в дрожжах *P. pastoris*» изложен метод культивирования дрожжей *P. pastoris* с необходимой интеграцией на средах VMGY и VMMY с метанолом в течение 72 часов. Результаты проверены при помощи электрофореза и вестерн-блот гибридизации. Белок VP2 весом 40 кДа соответствовал ожидаемому размеру. Автор также указал на возникающие проблемы, если этот белок кипятить в присутствии SDS.

В подразделе 2.2.4 «Изучение антигенных свойств рекомбинантной вакцины» описан опыт на цыплятах яичного направления, которых на 14-е сутки вакцинировали рекомбинантной вакциной и оценивали уровень антител к вирусу ИББ у суточных, 14-дн и 40-дн цыплят. Антитела в момент вакцинации отсутствовали или были на низком уровне, но уже через три недели их уровень был значительно выше, чем на 14 сутки.

В подразделе 2.2.5 «Определение стерильности вакцины» освещено определение стерильности лабораторных серий вакцины по ГОСТ 28085-2013.

В подразделе 2.2.6 «Определение бурсального индекса и безвредности» показано, что бурсальный индекс у птиц опытных групп был в пределах нормы, а безвредность вакцины установлена путем введения 5-кратной прививной дозы.

В главе 3 «Обсуждение результатов исследований» подведены итоги исследований и произведено сравнение с данными отечественных и зарубежных ученых.

В главе 4 «Заключение» представлены выводы, вытекающие из поставленных задач и отражающие результаты исследований.

Далее отдельными разделами представлены практические предложения, перспективы дальнейшей разработки темы. В Приложении представлена копия акта комиссионных испытаний вакцины.

#### **6. Подтверждение опубликования результатов в научной печати.**

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 2 работы в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, 6 публикаций в материалах научных и научно-практических конференций.

#### **7. Соответствие содержания автореферата материалам диссертации.**

Автореферат диссертационной работы Веретенникова Владислава Валерьевича на тему «Разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни» адекватно отражает содержание диссертации.

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

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

1. Почему выбрали именно эту дрожжевую систему экспрессии - *P. pastoris*, а не в других видах дрожжей, или не остановились на *Escherichia coli*?
2. Автор указывает: «Как видно в таблице 1 уровень материнских антител у суточных цыплят был не достаточно высок, поэтому на 14 сутки можно было увидеть невысокие титры антител» (табл. 1 автореферата, стр. 19; табл. 2 диссертации, стр. 74). В таблицах как раз показан высокий уровень антител у суточных цыплят. Та же техническая оплошность отмечена в Приложении.

3. В работе не обозначены критерии (пороговые значения) титров антител при проведении серологических исследований, не указаны конкретные серии диагностических наборов.
4. Рисунки №№ 4, 5, 6, 17 в диссертации неинформативны, вполне достаточно отражения их содержания в тексте.
5. В подразделе «Определение бурсального индекса и безвредности» нет статистической обработки вычисленных индексов, даны средние арифметические величины.
6. Почему не использовали внутримышечное введение препарата для оценки безвредности?
7. Как автор оценивает экономическую эффективность внедрения рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни, какова предполагаемая себестоимость препарата в сравнении с применяемыми в настоящее время вакцинами?
8. В качестве предложения и пожелания: дополнить дальнейшие исследования протективных свойств предложенной рекомбинантной вакцины проведением контрольного заражения высоковирулентным штаммом вируса ИББ.

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



## Заключение

Диссертационная работа Веретенникова Владислава Валерьевича на тему «Разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая по актуальности, новизне и практической значимости отвечает требованиям ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пункт 9 Положения о присуждении ученых степеней ВАК Министерства науки и высшего образования РФ), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент,  
главный научный сотрудник  
ФГБУ «Федеральный центр  
охраны здоровья животных»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)  
доктор ветеринарных наук, доцент



Ирза Виктор Николаевич

Тел.: +7 910 774 01 99

Адрес: 600901 г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Эл. почта: [irza@arriah.ru](mailto:irza@arriah.ru); [arriah@fsvps.gov.ru](mailto:arriah@fsvps.gov.ru)

Подпись В.Н. Ирзы заверяю:  
Ученый секретарь  
ФГБУ «ВНИИЗЖ»  
доктор ветеринарных наук, профессор



Русалеев  
Владимир Сергеевич

19 мая 2022г.