



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»
(ФГБНУ ФИЦВиМ)

601125, Россия, Владимирская область, Петушинский район, п. Вольгинский,
ул. Академика Бакулова, стр.1
Тел./факс: (4922) 37-92-51; 37-92-61,
e-mail: info@ficvim.ru; www.ficvim.ru

ОТЗЫВ

официального оппонента Луницина Андрея Владимировича на диссертационную работу Веретенникова Владислава Валерьевича «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.

Актуальность темы диссертационного исследования.

Птицеводство в Российской Федерации, развивается и функционирует на промышленной основе. Хозяйства промышленного типа имеют важнейшее значение для страны, так как обеспечивают жителей страны полезными для здоровья яйцами и диетическим мясом. Разведение птицы характеризуется тем, что оно имеет быстрые темпы воспроизводства поголовья. При этом затраты на разведение птицы не существенны в сравнении с прибылью от ее выращивания. Однако, высокая концентрация птицы на ограниченных площадях несет угрозы для промышленного птицеводства, одной из которых является занос на территорию хозяйства возбудителя инфекционной болезни, способного вызвать гибель птицы или резкое снижение продуктивности. Одним из опаснейших возбудителей инфекционных болезней является возбудитель инфекционной бурсальной болезни (болезни Гамборо).

Инфекционная бурсальная болезнь или болезнь Гамборо – представляет собой иммуносупрессивное вирусное заболевание кур, вызванное РНК-

содержащим, безоболочечным вирусом семейства *Birnaviridae*. Вирус приводит к воспалению фабрициевой сумки, а также лимфатической системы, сопровождается кровоизлияниями в мышцах и желудке. Бурсальная болезнь вызывает также снижение иммунитета у кур, что приводит к высокой смертности. В настоящее время болезнь присутствует в поголовье птиц на всех континентах.

Экономический ущерб от болезни Гамборо складывается из прямых потерь от снижения продуктивности или гибели птицы, а также косвенных потерь, связанных с проведением противозoonотических мероприятий, включая затраты на приобретение и применения вакцины. В промышленном птицеводстве применяются в основном живые и инактивированные вакцины, но интенсивное использование живых аттенуированных вакцин против ИББ может привести к увеличению вирулентности этого патогена из-за мутации, а применение инактивированных увеличивает затраты на профилактику.

В связи с этим возрастает актуальность разработки новых поколений защитных препаратов, в том числе рекомбинантных вакцин, которые экономически эффективны и не вызывают иммуносупрессию.

Таким образом, актуальность диссертационной работы Веретенникова Владислава Валерьевича, посвященная разработке рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни, впервые разработанной на территории Российской Федерации, не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций, сформированных в диссертации.

Диссертационная работа выполнена соискателем лично, на кафедре эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО СПбГУВМ Министерства сельского хозяйства РФ период с 2018 по 2021 гг.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертации, подтверждается результатами собственных исследований автора.

Достоверность и новизна исследований.

Научные положения и выводы обоснованы и базируются на аналитических и экспериментальных данных. Настоящая научная работа подкреплена фактическими данными, представленными в приведенных таблицах, рисунках и приложении. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных, наличие акта производственных испытаний результатов исследований подтверждают обоснованность и достоверность основных положений, выводов и предложений производству, представленных в диссертации.

Научная новизна заключается в том, что впервые разработана отечественная рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни, предназначенная для профилактики данной болезни, обеспечивающая выработку вируснейтрализующих антител в организме цыплят через три недели после вакцинации.

Соискателем изучена нуклеотидная последовательность гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «Синявинский», разработаны алгоритмы получения рекомбинантного белка VP2 и изготовления рекомбинантной вакцины, заключающийся во встраивании плазмидной ДНК с участком нуклеотидной последовательности белка VP2 вируса ИББ в дрожжевые клетки *Pichia pastoris*, с последующим синтезом и очисткой его, а также сорбции на адьюванте.

Значимость для науки и практики полученных результатов.

Впервые на территории Российской Федерации разработана и оценена вакцина нового поколения. Действие данной вакцины оценено с помощью клинических, патологоанатомических, вирусологических, серологических, бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов исследования, что позволяет расширить спектр средств специфической профилактики данной болезни.

Оценка содержания диссертации, её завершенность.

Титульный лист оформлен по общепринятому образцу. Диссертационная работа изложена в традиционной форме и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка использованной литературы и приложений. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, иллюстрирована 3 таблицами и 18 рисунками. Список литературы содержит 174 источника, в том числе 130 источников зарубежных авторов.

Автореферат содержит основные разделы диссертации и раскрывает ее научные положения. Выводы и практические предложения, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны. Диссертация и автореферат соответствуют критериям «Положения о присуждении ученых степеней».

Основные положения диссертации изложены в 8 научных работах, из них 2 - в периодических изданиях. В опубликованных материалах достаточно полно отражены результаты экспериментальной работы. Публикации, в которых изложены результаты диссертационной работы, соответствуют требованиям «Порядка о присуждении ученых степеней».

В главе «Введение» соискатель обосновал актуальность темы исследования, сформулировал цель и задачи исследований и из всего вышперечисленного логически вывел положения, выносимые на защиту. В данном разделе также отражены степень достоверности и апробация результатов, публикации по теме диссертации и структура диссертации.

В главе «Обзор литературы» диссертантом представлена информация о эпизоотологии, клинической картине, патологоанатомическим изменениям при инфекционной бурсальной болезни, характеристике вируса и его основных белков, а также особенностях иммунитета и использующихся сегодня в птицеводстве средствах специфической профилактики. Обзор изложен грамотным литературным языком, освещено большое количество современных публикаций по данной проблеме.

Глава «Собственные исследования» включает «Материалы и методы исследований» и «Результаты собственных исследований». В главе «Материалы и методы исследований» описан дизайн эксперимента и алгоритм создания рекомбинантной вакцины, начиная от выделения РНК и заканчивая проведением статистической обработкой результатов исследования. В разделе «Результаты собственных исследований» изложены 6 этапов опыта по синтезу рекомбинантного белка в дрожжах *Pichia pastoris*, а также оценки полученной конструкции при иммунизации восприимчивых цыплят, с последующей оценкой сывороток крови цыплят на наличие специфических антител к белку VP-2, как основных маркеров иммунитета. Кроме этого были оценены еще 3 основные характеристики препарата для профилактики болезни Гамборо: стерильность, бурсальный индекс и безвредность.

В главе «Обсуждение результатов исследований» автор подвел итоги своих исследований и сравнил их с данными, полученными зарубежными учеными.

В Заключении автор представил выводы, вытекающие из достигнутых в ходе работы целей и отражающие результаты исследований.

На основании проведенных исследований Веретенниковым Владиславом Валерьевичем сделано несколько практических предложений - применение вакцины в схеме лечебно-профилактических мероприятий птицеводческих хозяйств, проведение производственных испытаний на птицефабриках, а также использование полученного автором рекомбинантного белка VP2 вируса ИББ для разработки наборов ИФА для определения антител на векторные и рекомбинантные вакцины. Автор завершил диссертацию благодарностью научному руководителю и коллегам, и списком используемых сокращений. В Приложении представлена копия акт комиссионных испытаний вакцины.

В целом диссертационная работа Владислава Валерьевича Веретенникова представляет собой завершённую логически выстроенную научную работу, в которой выводы и результаты полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Замечания, вопросы и предложения по диссертации. Диссертация легко читается и воспринимается, хотя имеются замечания. Основные недочеты работы сводятся к отдельным неудачным выражениям, опечаткам.

В материалах и методах нет методики оценки активности вирусодержащего сырья для составления вакцины.

В списке сокращений есть такие сокращения, как: БМ, ВБГ, ВНА, ДСН, ЦПЭ, ЦИК, ХАО, но нет по тексту.

В процессе рецензирования диссертации к диссертанту возникли вопросы и замечания, на которые хотелось бы получить пояснения:

1. Желательно было бы автору дать в обсуждении результатов исследований пояснения о причинах агрегации рекомбинантного белка Vp2 в культуральной жидкости.

2. Важным моментом являются доказательства аутентичности полученных рекомбинантных молекул. С этой целью целесообразна дополнительная постановка иммуноблота с использованием поликлональной иммунной сыворотки переболевших или гипериммунизированных птиц.

3. Автору желательно было бы определить наличие углеводного компонента в рекомбинантном белке Vp2 (т.е. проверка процесса гликозилирования в клетках дрожжей) путем обработки дегликозидазами, которые расщепляют углеводный компонент. Необходимо было бы предоставить электрофореграмму гликозилированного и дегликозилированного белка.

4. Важнейшим показателем экспрессии рекомбинантного белка является генетическая стабильность и продуктивность полученных дрожжевых клеток и их паспортизация. Автору желательно было бы привести данные по количеству выхода рекомбинантного белка на мл культуральной жидкости.

5. Почему в качестве адьюванта для сорбции рекомбинантного белка был выбран ГОА?

Тем, не менее перечисленные недостатки не снижают научные и практические ценности диссертационной работы и не влияют на общую положительную оценку полученных результатов диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Веретенникова Владислава Валерьевича «Разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни», представляет собой завершённую, самостоятельную научно-квалификационную работу, которая по своей актуальности решаемой в ней задачи, научной новизне полученных результатов и их практической значимости, достоверности и обоснованности научных положений и выводов 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.

Заместитель директора по
производству и качеству
ФГБНУ ФИЦВиМ,
кандидат ветеринарных наук

Андрей
Владимирович
Луницин

Подпись Луницина А.В. ЗАВЕРЯЮ:
И.о. ученого секретаря
ФГБНУ ФИЦВиМ,
кандидат биологических наук



А.Г. Гузалова

17.05.2022 г.