

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Вороной Маргариты Сергеевны «Получение антигенов *Avibacterium paragallinarum* для инактивированных вакцин» на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология», представленную к защите в диссертационный совет Д 220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

### Актуальность темы.

Актуальность выбранной темы не вызывает сомнений, поскольку инфекционный ринит кур в последнее время получил широкое распространение во всех странах мира с развитым птицеводством, в том числе в России. Специфическая профилактика является надежным и часто единственным способом предотвращения эпизоотий. Вакцинация птиц обеспечивает выработку напряженного иммунитета, обусловленного наличием антигемагглютинирующих антител, что обеспечивает здоровье животных и напрямую влияет на качество и безопасность продовольственной продукции.

Гемофилез птиц, борьбу с которыми выбрала в качестве своей научной работы М.С. Воронина, приводит к существенным экономическим потерям, складывающимся из ущерба от снижения яйценоскости, выбраковки цыплят, затрат на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий. При неосложненной форме инфекционного ринита, заболеваемость птиц может достигать 100%, при низкой, не превышающей 1% летальности. Однако при ассоциированном течении гемофилеза с эшерихиозом, пастереллёзом, микоплазмозом, вирусными инфекциями, может погибать до 30% птицы. При этом переболевшая птица на длительное время остается бактерионосителем, что способствует сохранению и распространению возбудителя.

Основным звеном в системе мер борьбы с инфекционным ринитом кур является вакцинация. Но в РФ в настоящее время для борьбы с заболеванием применяются только иностранные вакцины, поэтому создание новой безопасной и иммуногенной вакцины против гемофилеза является актуальной и соответствует принципу импортозамещения. Работа Вороной М.С. позволяет отрегулировать и усовершенствовать технологический процесс получения антигенов *Avibacterium paragallinarum*, что обеспечивает стабильное получение значительных объёмов бактериального сырья для инактивированных вакцин.

**Целью** работы соискателя является разработка технологии получения антигенов *A. paragallinarum* для изготовления инактивированных вакцин.

**Научная новизна диссертационной работы** заключается в том, что, автором усовершенствована технология культивирования штаммов *A. Paragallinarum*, а именно

подобраны оптимальные питательные среды, определены параметры культивирования штаммов в лабораторных условиях, обоснованы режимы инактивации антигенов без потери их качества, а также изготовлены экспериментальные образцы инактивированной эмульгированной вакцины против инфекционного ринита кур. В результате проведенных доклинических испытаний наглядно показана безопасность и эффективность данного препарата, а также стабильность свойств в процессе хранения.

**Практическая значимость** работы заключается в том, что отработана новая технология культивирования *A. paragallinarum*, которая позволяет получать большее количество антигена за один производственный цикл. Оформленная научно-техническая документация может быть использована при изготовлении и контроле «Вакцины против инфекционного ринита кур инактивированной эмульсионной». Вышеописанные процессы диссертант грамотно изложила в трех методических рекомендациях по определению уровня антител к *A. paragallinarum* в реакции торможения гемагглютинации, глубинному культивированию бактерий *A. paragallinarum* и инактивации бактерий *A. paragallinarum* формалином, которые используются при производстве вакцины против инфекционного ринита кур инактивированной эмульсионной. В результате проведенной научно-исследовательской работы в коллекции были депонированы производственные штаммы *A. paragallinarum* №6261 (серогруппа А) и 1919 (серогруппа С).

Заявленные технологические приемы обеспечивают получение эффективного препарата стабильного качества, применение которого снизит заболеваемость и экономические потери от инфекционных болезней.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность.**

Представленные научные достижения обоснованы и подтверждены на заседаниях комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ» по заслушиванию выполнения индивидуальных планов аспирантов. Экспериментальные данные, выводы, рекомендации основаны на общепринятых теоретических закономерностях, не противоречат друг другу и согласуются с известными концепциями в области ветеринарной микробиологии и биотехнологии. Достоверность экспериментальных данных обеспечивается применением современных методов исследования, выполненных на лабораторном оборудовании с высоким классом точности. Научные положения, выносимые на защиту, апробированы и доложены на международной научно-практической конференции.

**Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.**

Результаты исследований Ворониной М.С. представляют теоретическую и практическую ценность и могут быть использованы при изготовлении и контроле вакцины против инфекционного ринита кур.

Диссертантом обоснован антигенный состав экспериментальной вакцины против инфекционного ринита кур и усовершенствована технология получения и инактивации антигенов *A. paragallinarum*. Учитывая, что полученные экспериментальные образцы показали высокую антигенную и иммуногенную активность, а также не обладали выраженной реактогенностью, разработанная автором вакцина может быть рекомендована для внедрения в ветеринарную практику после регистрации Россельхознадзором РФ.

Также разработанные методы получения антигенов могут быть использованы при создании ассоциированных вакцин против наиболее значимых инфекционных заболеваний птицы, где бактериальная масса *A. paragallinarum* будет включена как отдельный компонент.

#### **Степень завершения диссертационной работы и качество её оформления.**

Диссертационная работа Ворониной М.С. представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком методическом уровне с использованием современных методов анализа. Диссертация логично построена и оформлена в соответствии с требованиями.

#### **Общая оценка содержания диссертации.**

Работа построена по классическому принципу, состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключения, списка общепринятых сокращений, списка литературы и приложений, подтверждающих проведенные работы и результаты исследований.

В представленной работе диссертант наглядно обосновывает выбор темы и её актуальность, определяет цель и задачи работы, формулирует научную новизну и практическую значимость. В разделе «Обзор литературы» представлены основные сведения об инфекционном рините кур, включая историю изучения заболевания, эпизоотологию и распространенность на территории РФ, описаны биологические свойства возбудителя - *A. paragallinarum*. Широко освещены диссертантом особенности культивирования *A. paragallinarum*, питательные среды, используемые для получения качественных антигенов, представлен обзор и сравнение вакцин против инфекционного ринита кур, зарегистрированных в стране. Автором, на основе проведенного анализа, показано, какие технологические методы и приемы могут быть изучены и усовершенствованы, и обоснована необходимость таких исследований. Особое внимание в работе уделено необходимости изменений методики инактивации микробных клеток

различными химическими агентами, поскольку это влияет на безопасность и эффективность иммунобиологических средств, и использованию различных адъювантов. Вопросы внесения изменений в технологические аспекты получения вакцин против инфекционного ринита кур проанализированы диссертантом в полном объёме.

Раздел «Результаты собственных исследований» отражает данные о биологических свойствах, как выделенных вирулентных изолятов *A. paragallinarum* серогрупп А и С, так и штаммов серогруппы В, депонированных в коллекции ФГБУ «ВНИИЗЖ». Диссертант самостоятельно изучала гемагглютинирующую активность бактерий *A. paragallinarum*, а так же антигенные свойства в отношении референтного АТСС штамма серогруппы А. Данный анализ свидетельствует о перспективности их использования в целях получения качественных антигенов при разработке инактивированных вакцин против гемофилеза птиц.

Разработка технологии получения бактериальной массы *A. paragallinarum* включала в себя: изучение динамики роста штаммов на различных питательных средах, определение оптимальной концентрации НАДФ и количества сыворотки крови лошади в питательной среде, определение режима глубинного культивирования, аэрации и изучение динамики показателей рН и еН суспензии при культивировании. Диссертантом представлена динамика роста штаммов *A. paragallinarum* и определение продолжительности культивирования в ходе которой установлено, что максимальное накопление микробных клеток получено с использованием соево-казеиновым бульоном с содержанием 6,75 мкг/см<sup>3</sup> НАДФ и 5 % сыворотки крови лошади, при этом подача в ферментер смеси воздуха и углекислого газа существенно стимулирует рост бактерий через 10 часов после начала культивации.

Для разработки технологии инактивации бактерий *A. paragallinarum* проводилось изучение свойств антигенов, инактивированных формалином (0,1%) и тимеросалом (0,04%) как *in vitro*, так изготовленных из них образцов эмульсионных вакцин *in vivo*. Воронина М.С. установила, что использование формолинизированного антигена *A. paragallinarum* позволяет получить препарат со стабильными антигенными свойствами при хранении в течение 24 месяцев, в то время как инактивированный тимеросалом антиген снизил активность уже через 12 месяцев.

Диссертант даёт оценку качества моноантигенов и обосновывает состав экспериментальной эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур и эффективность каждого компонента. Представлены положительные результаты доклинических исследований по изучению безвредности и эффективности (антигенной и иммуногенной активности) экспериментальной вакцины на естественно восприимчивых

животных, что позволяет перейти к следующему этапу - клиническим испытаниям данного вакцинного препарата.

Соискателем обобщены результаты исследований и проведен объективный анализ данных, что позволяет сделать заключение об эффективности внедренных в практику технологических методов культивирования и обработки бактериального сырья, что положительно сказывается на антигенности и иммуногенности экспериментальной вакцины против гемофилеза кур и в дальнейшем, после регистрации препарата, сможет способствовать обеспечению эпизоотологического благополучия в РФ.

Работа завершена 7 выводами, объективно отражающими результаты выполненных исследований, и практическими предложениями. По теме диссертации опубликовано 4 статьи, в том числе 3 в рецензируемых журналах. Содержание автореферата отражает основные материалы, изложенные в диссертации, соответствует положениям, выносимым на защиту и выводам диссертационной работы.

#### **Замечания по работе.**

Диссертационная работа Ворониной М.С. позволяет сделать вывод о высоком методическом уровне проведенных исследований, согласованности и объективности выводов, подкрепленных результатами экспериментальных данных, которые объективно и логично систематизированы автором. Принципиальных замечаний по диссертации нет, однако стоит указать на незначительное количество грамматических и орфографических ошибок, и задать следующие вопросы:

1. В чем принципиальное отличие разрабатываемой Вами вакцины против инфекционного ринита кур инактивированной эмульсионной от существующей, зарегистрированной вакцины против гемофилеза птиц инактивированной эмульсионной?
2. В диссертации на стр. 90 табл. «Иммуногенность вакцины против инфекционного ринита кур» указано, что заражение штаммом №1919 вызвало заболевание всех птиц в контрольной группе, а в автореферате – 90 % цыплят не заболели, что ставит под сомнение корректность проведенного опыта. Что из этого является верным?
3. Объясните механизм диссоциации бактерий сем. Pasteurellaceae при хранении в замороженном и лиофилизированном состоянии, как указано в диссертации на стр. 92.
4. Название «Методические рекомендации по инаktivации бактерий *Avibacterium paragallinarum* формалином», указанное в тексте диссертации, не совпадает с названием в приложении №3.

#### **Заключение.**

Диссертационная работа Ворониной Маргариты Сергеевны «Получение антигенов *Avibacterium paragallinarum* для инаktivированных вакцин» является



законченной научно-квалифицированной работой, имеющей научное и прикладное значение. В результате проведенных исследований достигнута цель и выполнены поставленные задачи. Результаты исследований, а именно изученные штаммы микроорганизмов, новые методы изготовления питательных сред и получение антигенов глубинным методом культивирования бактерий, методика инактивации формалином и тиомерсалом, определение уровня антител к *A. paragallinarum* в реакции торможения гемагглютинации, по которым разработаны методические указания, могут быть использованы в микробиологии, биотехнологии и ветеринарии. Тема диссертационной работы соответствует профилю диссертационного совета и паспорту специальности.

Диссертационная работа Ворониной М.С. представляет собой законченное научное исследование, которое по актуальности выбранной темы, новизне и уровню выполненных исследований, объёму экспериментальных данных, теоретической и практической значимости полученных результатов, соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а автор работы, Воронина Маргарита Сергеевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология».

Официальный оппонент  
доктор биологических наук, доцент  
заместитель директора  
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Капустин Андрей Владимирович

109428, Москва, Рязанский проспект, дом 24, корпус 1,

«Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук»

e-mail: admin@viev.ru, тел./факс (495) 970-03-69

Подпись Капустина А.В. заверяю,  
учёный секретарь ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,  
кандидат биологических наук  
08.04.2021 г.



Исаев Юрий Геннадьевич