

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Сухинина Александра Александровича на диссертационную работу Губенко Олеси Григорьевны на тему «Разработка тест-систем на основе иммуноферментного анализа для диагностики болезни Шмалленберг», представленной к защите в диссертационный совет Д 220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 — вирусология

### **Актуальность темы выполненной работы**

Болезнь Шмалленберг – трансмиссивная арбовирусная инфекция крупного рогатого скота, овец и коз всех возрастных групп, характеризующаяся, лихорадкой, истощением и снижением удоев.

Вспышки данной болезни регистрировали в период с 2012 по 2014 гг. в странах ЕС (Нидерланды, Германия, Бельгия, Англия, Франция, Италия, Испания, Дания, Люксембург, Швейцария, Швеция, Австрия, Польша, Финляндия, Ирландия, Норвегия, Греция, Словения, Латвия и др.).

За 2016-2018 гг. в литературе появлялись многочисленные данные о случаях повторного выявления антител к вирусу БШ в странах ЕС – Великобритании, Ирландии, Бельгии. Также выявлено массовое распространение данного возбудителя среди КРС в Эфиопии, Китае, и в популяции лошадей в Республике Иран.

Согласно последним исследованиям установлено, что основная передача вируса БШ животным осуществляется через укусы кровососущих насекомых – *Culicoides*. Поэтому данное заболевание носит сезонный характер и спрогнозировать его дальнейшее распространение достаточно сложно.

Отличительной особенностью является то, что если заражение животных происходит на стадии стельности, то заболевание приводит к абортam и мертворождениям, что влечет за собой значительные экономические потери в случае массового распространения.

Диагностику болезни проводят на основании комплекса методов, включающих в себя выявление вирусного генома методом ПЦР в реальном времени, а также выделение в культуре клеток насекомых (КС), золотистого хомячка (ВНК), почек обезьяны (Vero) или при интрацеребральном заражении мышей-сосунов как родственной вирус болезни Акабане. Для серологической диагностики применяют иммуноферментный анализ (ИФА), реакции непрямой иммунофлюоресценции и вируснейтрализации.

В настоящее время широкое распространение в лабораторной диагностике получил метод иммуноферментного анализа (ИФА/ELISA), главными достоинствами которого являются высокая чувствительность и специфичность.

Для проведения лабораторного надзора, в том числе для установления степени распространения БШ в инфицированных странах, а также оценить серологический статус отдельных животных, необходимо иметь простой в использовании анализ, такой как метод ИФА, позволяющий быстро проводить скрининг больших популяций.

Из выше изложенного следует, что выбранное автором направление исследований представляется своевременным и актуальным.

**Научная новизна результатов исследований заключается в следующем.** Вирус болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4», выбранный в качестве диагностического, адаптирован к перевиваемым линиям культур клеток, оптимизированы параметры его культивирования.

Разработаны отечественные тест-системы на основе иммуноферментного анализа с применением в качестве антигена штамма «ВН80/11-4» вируса болезни Шмалленберг:

Тест-система на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена.

Тест-система на основе конкурентного варианта ИФА для выявления антител в сыворотках крови восприимчивых животных.

**Научно-практическая значимость работы.** Вирус болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4», выбранный в качестве диагностического при разработке тест-систем на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена вируса БШ и конкурентного варианта ИФА для выявления антител к вирусу БШ, адаптирован к перевиваемым линиям культур клеток.

Выделенный на территории Калининградской области изолят вируса БШ депонирован в Коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» как штамм «ВБШ/Калининград/2016» и может быть использован при разработке диагностических препаратов и их контроля при диагностике БШ КРС.

В ходе выполнения научно-исследовательских работ по теме диссертации разработаны, комиссионно проверены, утверждены на ученом совете ФГБУ «ВНИИЗЖ» следующие методические рекомендации:

1. Методические рекомендации по очистке и концентрированию антигена вируса болезни Шмалленберг;

2. Методические рекомендации по выявлению антигена вируса болезни Шмалленберг в твердофазном непрямом «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа;

3. Методические рекомендации по выявлению антител к вирусу болезни Шмалленберг в конкурентном варианте иммуноферментного анализа.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 120 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, приложения; иллюстрирована 19 таблицами и 25 рисунками. Список использованной литературы включает 127 источников, из них 97 иностранных. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

В разделе введение автор убедительно обосновывает актуальность выбранной темы, новизну и практическую значимость проведенной работы, а также четко формулирует основные положения, выносимые на защиту, содержит все необходимые регламентированные разделы.



Цель и задачи работы сформулированы ясно и верно. Целью данной работы являлась разработка диагностических тест-систем на основе полученного штамма вируса БШ для выявления антигена и антител к нему в сыворотках крови животных при проведении серологических исследований в ИФА.

Раздел **«Обзор литературы»** достаточно полно представляет анализ научной информации по проблеме и по теме диссертации. Приведены: характеристика вируса болезни Шмалленберг; рассмотрена эпизоотическая ситуация по болезни Шмалленберг в мире, особенности клинического проявления при болезни Шмалленберг. Освещены вопросы диагностики и профилактики болезни Шмалленберг. Обзор написан хорошим языком, информативен. Рисунки, приведенные в обзоре, полно иллюстрируют данные литературы.

**Собственные исследования** автора начинаются разделом **«Материалы и методы»**, в котором подробно изложены сведения об объектах изучения, методах испытаний и приборах, использованных в экспериментах. Приведены характеристики использованных в работе штаммов вируса болезни Шмалленберг, представлены методики исследования по культивированию вируса БШ, получению, титрованию и очистке вирусосодержащего материала. Указаны методы статистической обработки.

Раздел **“Результаты собственных исследований”** включает четыре главы, которые посвящены решению представленных в работе задач.

Глава 1 посвящена полученным результатам по адаптации вируса болезни Шмалленберг штамм «ВН80/11-4» к культурам клеток и подбору оптимального режима культивирования вируса в культурах клеток ВНК-21/13 и ПС.

В главе 2 собственных исследований рассмотрены результаты проведенной экспериментальной работы по разработке тест-системы на основе непрямого «сэндвич»-варианта ИФА; получения препаратов антигена вируса болезни Шмалленберг и специфических к вирусу болезни Шмалленберг гипериммунных сывороток крови кроликов и морских свинок. Определены рабочие разведения детекторных антител и антивидового конъюгата; рабочие разведения улавливающих антител. Проведено тестирование очищенных препаратов антигена вируса болезни Шмалленберг с помощью разработанного непрямого «сэндвич»-варианта ИФА.

Глава 3 посвящена разработке конкурентного варианта ИФА (К-ИФА); подбору оптимальных условий постановки реакции; определению оптимальных разведений антигена и гипериммунной сыворотки кролика, оптимального разведения антивидового конъюгата. Представлены результаты допустимых значений оптических плотностей контрольных сывороток; определен позитивно-негативный порог разработанной тест-системы К-ИФА. Даны основные валидационные характеристики тест-системы.

В главе 4 собственных исследований приводятся полученные автором данные о результатах исследования сывороток крови КРС на наличие антител к вирусу болезни Шмалленберг; результаты опыта по изучению сероконверсии среди импортного скота, завезенного на территорию Воронежской области; результаты выделения изолята вируса болезни Шмалленберг из проб биоматериала в культуре клеток.

В разделе “Заключение” обобщены результаты проведенных исследований. Автором проведен анализ итогов проделанной работы с учётом данных литературных источников. Соискатель на высоком профессиональном уровне анализирует полученные результаты, тщательно обосновывая последующие основные выводы. Диссертация завершается выводами, которые логически вытекают из полученных результатов, соответствуют поставленным задачам и согласуются с положениями, сформулированными в работе. Обоснованность выводов определяется результатами исследований, полученными на значительном материале. Диссертация написана литературным языком, оформлена и иллюстрирована в соответствии с действующим стандартом.

Диссертация написана автором самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку.

Для практического использования автором диссертации предложено: непрямой «сэндвич»-варианта ИФА для выявления антигена вируса БШ и конкурентный вариант ИФА для выявления антител к вирусу БШ; штамм «ВБШ/Калининград /2016» для диагностики БШ КРС; 3 методические рекомендации.

Основные научные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях.

В диссертации соискатель ссылается на автора и источник заимствования материала.

В целом, автором было проведено объёмное исследование, в результате которого были полностью решены задачи, поставленные в работе. Диссертационная работа Губенко О.Г. является логичным, аргументированным и полноценным научным исследованием. Принципиальных замечаний к диссертации нет. Автореферат диссертационной работы отражает содержание диссертации.

Оценивая в целом положительно представленную к защите диссертационную работу Губенко Олеси Григорьевны, отмечая ее завершенность и практический вклад, все же имеется ряд вопросов:

1. При подтверждении наличия генома вируса Шмалленберга Вы использовали методику Bilk et al. (2012 г.). Применялся ли в методике внутренний контрольный образец (ВКО), для контроля прохождения реакции?

2. На стр.55 Вы пишете: "Реакция с нормальной неинфицированной культурой клеток не превышала фоновый уровень." Какой уровень?

3. Почему исследования для сравнения разрабатываемой тест-системы проводились с тест-системой «Schmallenberg virus Competition Multi-species» фирмы IDVET (Франция), а например не с ID Screen® Schmallenberg virus Indirect или ID Screen® Schmallenberg virus Indirect (Screening test) той же фирмы?

4. Имеет ли корреляцию разработанная Вами тест-система в сравнении с реакцией нейтрализации?

5. Какова экономическая эффективность использования разработанной Вами тест-системы, по сравнению с «Schmallenberg virus Competition Multi-species» фирмы IDVET (Франция)?



### **Заключение.**

Диссертационная работа Губенко Олеси Григорьевны на тему «Разработка тест-систем на основе иммуноферментного анализа для диагностики болезни Шмалленберг», представленной к защите в диссертационный совет Д 220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 — вирусология является завершённым научно-квалификационным трудом, содержащим решение актуальной задачи – разработке методов контроля за инфекционными болезнями крупного рогатого скота, имеющие большое научно-практическое значение. По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Губенко Олеси Григорьевны отвечает п. 9 Положения “О порядке присуждения учёных степеней”, утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля № 335, от 2 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 1 октября 2018 года № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор Губенко Олеся Григорьевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02- вирусология.

Официальный оппонент

Зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный

университет ветеринарной медицины»

доктор биологических наук, профессор  Сухинин Александр Александрович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

20 ноября 2020 года

Адрес организации: 196084, Российская Федерация, Санкт-Петербург,  
Черниговская ул., д. 5.

Телефон: +7 (812) 388 36 31, адрес электронной почты: [secretary@spbguvm.ru](mailto:secretary@spbguvm.ru).

Подпись Сухинина Александра Александровича

заверяю:

Ученый секретарь Ученого совета

ФГБОУ ВО СПбГУВМ

Доктор ветеринарных наук



Н.А. Гаврилова