

**ФГБНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ И
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**
141142, Московская обл., Щелковский р-н, пос. Биокомбината, д. 17, ВНИТИБП,
т./факс: 8 (496) 56-732-63; E-mail: vnitibp@mail.ru

Директор ФГБНУ «ВНИТИБП»,
академик РАН



А.Я.Самуйленко
«7» ноября 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБНУ ВНИТИБП «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» на диссертационную работу **Серовой Натальи Юрьевны** на тему «Индикация и идентификация изолятов вируса инфекционного бронхита кур, циркулирующих на территории Российской Федерации», представленную в Диссертационный совет Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия 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

Инфекционный бронхит кур (ИБК) – высококонтагиозная болезнь, которая широко распространена в птицеводческих хозяйствах РФ, поражает птиц всех возрастов в хозяйствах мясного и яичного направлений. На долю инфекционного бронхита кур приходится около 20% всех болезней органов дыхания птицы. Экономический ущерб велик, он складывается из потери веса птицы, ее гибели, снижения яйценоскости до 89%, гибели эмбрионов. Некоторые штаммы вызывают нефрозную патологию со значительной смертностью молодняка.

Возбудитель ИБК – РНК-содержащий вирус, семейства Coronaviridae, чрезвычайно изменчив, поэтому небольшие замены в гене S1 приводят к появлению новых серотипов вируса, что затрудняет правильную постановку

диагноза и не позволяет своевременно провести эффективную специфическую профилактику против данной болезни.

На территории РФ циркулируют вирусы ИБК разных серогрупп. Выделяются энзоотичные для России изоляты, имеющие более 20% отличий от всех представленных в Genbank. Хотя инфекционный бронхит в первую очередь респираторное заболевание, он также является одной из важных причин снижения яичной продуктивности. Основной ущерб птицеводства обусловлен неэффективностью производства.

Существующие методы выделения и идентификации вируса ИБК имеют некоторые недостатки. Вирусологические методы выделения вируса требуют большого количества времени, реакция нейтрализации трудоемка и долговременна, антиген-улавливающий и блокирующий варианты непрямого метода ИФА требуют использования моноклональных антител, что не всегда возможно, реакция диффузионной преципитации малочувствительная.

Таким образом, высокая изменчивость вируса инфекционного бронхита кур, постоянно возникающие новые варианты вируса обуславливают актуальность разработки специфичного и чувствительного метода идентификации, позволяющего проводить массовые исследования для контроля циркулирующих вариантов вируса с использованием отечественных реактивов и препаратов.

В связи с вышеизложенным, тема диссертационной работы Серовой Натальи Юрьевны, целью которой является усовершенствование метода индикации и идентификации вируса инфекционного бронхита кур с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции для последующего изучения изолятов, циркулирующих на территории РФ, является актуальной.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

- выделить изоляты вируса инфекционного бронхита кур;
- изучить физико-химические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур;

– усовершенствовать тест-систему для индикации и идентификации вируса ИБК с помощью ОТ-ПЦР и оценить возможность использования данного метода для лабораторной диагностики ИБК при исследовании патологического материала;

– определить молекулярно-генетические характеристики и провести филогенетический анализ изолятов вируса ИБК, выявленных на территории Российской Федерации.

Научная новизна

Новизна представленной диссертации заключается в усовершенствовании метода индикации и идентификации вируса инфекционного бронхита кур с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием отечественных препаратов, и реактивов. Впервые выявлены и идентифицированы варианты изоляты вируса инфекционного бронхита кур, которые представляют интерес для дальнейшего изучения. Впервые определена нуклеотидная последовательность фрагментов S1 и 3'UTR участков 11 полевых изолятов вируса ИБК. Проведено сравнение полученных последовательностей с опубликованными в GenBank различных изолятов и штаммов вируса ИБК.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании проведенных исследований усовершенствован метод диагностики инфекционного бронхита кур методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции по выявлению и идентификации вируса ИБК и коронавируса индеек в патологическом материале.

Разработаны и утверждены методические положения для выявления вируса инфекционного бронхита птиц методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Выделенные изоляты могут использоваться для разработки живых и инактивированных вакцин с целью профилактики ИБК, для создания опытных образцов рекомбинаций S1 участков генетически различных серовариантов вируса ИБК.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в которых изложены основные положения и выводы по работе, из них 3 статьи – в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утверждённых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Содержание работы и достоверность полученных результатов.

Диссертация изложена по общепринятому стандарту на 106 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение, основная часть, заключение, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов, список литературы и приложения. В приложении представлены документы, подтверждающие результаты выполнения отдельных этапов работы, их научное и практическое значение.

Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 24 рисунками и 1 формулой. Список литературы включает 92 источника, из которых 61 зарубежный.

Во «Введении» автором аргументировано обосновано выбранное направление исследований и обозначены вопросы, подлежащие изучению, а также положения диссертации, выносимые на защиту. Представлены сведения о значимости работы для ветеринарной науки и практики, ее объеме и структуре, данные о проведенных апробациях и личных публикациях.

Обзор литературы всесторонне характеризует возбудителя инфекционного бронхита кур, особенности распространения, пути передачи вируса ИБК, структуру генома, методы диагностики болезни.

Собственные исследования состоят из двух разделов: методология и методы исследования и результаты исследований.

В разделе "Материалы и методы" приведена подробная характеристика применяемых методов, лабораторного оборудования, использованных при получении результатов и их анализе. Представленные материалы и методы

исследований, объем проведенных экспериментов, на наш взгляд, обеспечивают выполнение поставленных перед диссертантом задач, достоверную интерпретацию результатов и научное обоснование выводов.

В разделе «Собственные исследования» диссертантом представлены подразделы, в которых изложена информация по полученным результатам в соответствии с поставленными задачами.

Проведены экспериментальные исследования по выделению изолятов вируса инфекционного бронхита кур, условий культивирования их на развивающихся эмбрионах кур, определению чувствительности изолятов вируса к некоторым химическим и физическим факторам (эфир, хлороформ и повышенные температуры).

Автором разработан метод выявления вируса инфекционного бронхита с помощью обратной транскрипции полимеразной реакции, для чего проведен анализ геномных последовательностей вируса ИБК из международной базы данных GenBank и определены оптимальные олигонуклеотидные последовательности праймеров. Специфичность метода была проверена на различных образцах биологического материала, содержащих разные штаммы вируса ИБК и нескольких видов РНК-содержащих вирусов (вирус ньюкаслской болезни, метапневмовирус птиц, вирус инфекционной бурсальной болезни, реовирус). Положительная реакция наблюдалась только с РНК вируса инфекционного бронхита кур, что свидетельствовало о специфичности метода.

В результате проведенных исследований были сконструированы олигонуклеотидные праймеры характеризующиеся высокими показателями ПЦР, фланкирующие консервативный нетранслируемый участок 3'UTR вируса инфекционного бронхита кур длиной 277-433 п.н., которые рекомендовано использовать для диагностики инфекционного бронхита кур и коронавирусной инфекции индеек.

Усовершенствован метод выявления РНК коронавируса птиц за счет использования видоспецифичных праймеров к консервативному нетранслируемому участку 3'UTR вируса и оптимизированных

параметров реакции, что обеспечивает образование специфичных ампликонов длиной 277-433 п.н. Чувствительность метода показала выявление $3,3 \times 10^5$ копий молекул кДНК на мл.

Секвенирование ампликонов, образованных в результате метода подтвердило их генетическую принадлежность к вирусу ИБК.

Апробация методики на образцах генетического материала гомологичных (4/91 793В, D1466, Massachusets 41, D388 QX) и гетерологичных (вирус НБ, МПВИ, ИББ, РВТ) вирусов птицы показала ее высокую специфичность.

При исследовании 105 образцов патологического материала от домашней птицы была идентифицирована РНК вируса ИБК в 25 образцах. В диагностических исследованиях данный метод применяли с 2015 года.

В процессе работы выявлены, идентифицированы и изучены свойства двух изолятов вируса ИБК от кур несушек птицеводства яичного направления (Омской области) и цыплят-бройлеров птицеводства мясного направления (Саратовской области). Изолятам были присвоены названия RF/09/00 и RF/12/01 соответственно. Биологическая активность изолята RF/09/00 к 5 пассажу достигла $5,5 \lg$ ЭИД_{50/0,2} см³, изолята RF/12/01 к 6 пассажу $4,5 \lg$ ЭИД_{50/0,2} см³.

Пробы экстраэмбриональной жидкости куриных эмбрионов, зараженных выделенными полевыми изолятами, были исследованы методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с праймерами, ограничивающими вариабельную область гена S1 вируса инфекционного бронхита кур. С последующим секвенированием фрагментов кДНК изолятов и сравнительным анализом с известными зарубежными и российскими штаммами вируса инфекционного бронхита кур. Для сравнительного анализа изолята «RF/12/01» был использован фрагмент вариабельной области гена S1 длиной 701 п.н. (позиция на геноме 20281-20981 п.н.) относительно штамма Mass41 (GenBank: GQ504725.1).

Секвенирование фрагмента кДНК изолята «RF/12/01» и последующий сравнительный анализ показали, что он не входит ни в одну генетическую группу и имеет более 25% отличий от всех известных зарубежных и российских штаммов вируса инфекционного бронхита кур, т.е. может быть обозначен как вариантный изолят.

Нуклеотидная последовательность вариабельной области гена S1 данного изолята депонирована в EMBL (Accession number AJ550983). Нуклеотидные последовательности вариабельной области гена S1 изолятов «RF/12/01», «RF/09/00», «RF/467/16», «ГС-11» депонированы в международной базе данных. Изоляту «RF/12/01» присвоен номер AJ550983, изоляту «RF/09/00» - KY120169, изоляту «RF/467/16» - KY120168, изоляту «ГС-11» - KY211873. Выделенные и генотипированные четыре изолята вируса ИБК («RF/12/01», «RF/09/00», «RF/467/16», «ГС-11») представляют интерес для их дальнейшего изучения с целью паспортизации и изготовления на их основе вакцин, в том числе рекомбинантных для профилактики ИБК.

В обсуждении приведен критический анализ полученных результатов в сопоставлении с данными научной литературы.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Выполненные исследования посвящены усовершенствованию метода диагностики инфекционного бронхита кур методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Выделенные изоляты могут использоваться для разработки живых и инактивированных вакцин с целью профилактики ИБК.

Результаты научных исследований легли в основу Методических положений по выявлению вируса инфекционного бронхита кур с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Методические положения утверждены Врио директора ВНИВИП.

Материалы научных исследований используются для проведения лабораторных и практических занятий с аспирантами очного обучения и для чтения лекций на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов, работающих в области промышленного птицеводства.

Оценка работы, замечания и предложения

Результаты опытов профессионально проанализированы и корректно изложены в промежуточных заключениях и окончательных выводах. Выводы по итогам работы обоснованы и в целом вытекают из результатов проведенных исследований.

Автореферат отражает основное содержание диссертации, опубликованные работы достаточно полно освещают результаты экспериментов.

Оценивая работу автора в целом положительно, считаем необходимым задать автору следующие вопросы:

1. При отборе кур для выделения изолятов вируса ИБК диагноз ставился только на основе клинико-патологических изменений или же подтверждался диагностическими тестами: РДП, РН, ИФА ?
2. Методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции выявляется вирус, наличие которого определяется, как при заболевании птицы, так и после вакцинации. Не исключены ложноположительные результаты. Какой метод для подтверждения диагноза ИБК рекомендует автор?
3. Предполагается ли внедрение в ветеринарную практику усовершенствованного метода индикации и идентификации вируса ИБК?

Вышеуказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают научную и практическую значимость полученных результатов и ее общую положительную оценку.

Заключение

Диссертация Серовой Натальи Юрьевны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему: «Индикация и идентификация изолятов вируса инфекционного бронхита кур, циркулирующих на территории Российской Федерации», является законченной научно-исследовательской работой, в которой на основании выполненных исследований и разработок осуществлено решение научно-практической проблемы, имеющей важное значение для промышленного птицеводства.

По своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объему выполненных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Серовой Н.Ю. отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения» ВАК РФ), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности: 06.02.02 – «ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология».

Отзыв заслушан, рассмотрен и одобрен на совещании сотрудников отдела обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства ФГБНУ ВНИТИБП (протокол № 2 от 2 ноября 2017г.)

Ведущий научный сотрудник отдела
обеспечения качества лекарственных
средств для ветеринарии и животноводства,
доктор биологических наук, старший
научный сотрудник

Т.А. Скотникова

Ведущий научный сотрудник отдела
обеспечения качества лекарственных
средств для ветеринарии и животноводства,
доктор биологических наук

Л.А. Люлькова

Подписи Скотниковой Т.А. и
Люльковой Л.А. заверяю
Начальник отдела качества:



В.Ю. Глинская
7 ноября 2017г.