



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

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



Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру. Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.  
Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

«23» октября 2017 г. Председателю  
диссертационного совета Д 220.059.03  
при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская ГАВМ»  
доктору биологических наук А.А. Сухину  
№ 01-07 / 10821

### ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**Серовой Натальи Юрьевны**

**«Индикация и идентификация изолятов вируса инфекционного бронхита кур,  
циркулирующих на территории Российской Федерации»,**

представленную 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. 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. В работах отечественных авторов описано широкое распространение вариантных изолятов вируса ИБК, описаны молекулярно-генетические свойства рекомбинантных вирусов ИБК циркулирующих на территории РФ. Хотя инфекционный бронхит в первую очередь респираторное заболевание, он также является одной из важных причин снижения яичной продуктивности. Некоторые штаммы вызывают нефрозную патологию со значительной смертностью молодняка. Основным ущерб птицеводствам 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 требует использования моноклональных антител, что не всегда возможно, реакция диффузионной преципитации малочувствительна.

Таким образом, высокая изменчивость коронавируса птиц, постоянно возникающие новые варианты обуславливают актуальность разработки специфичного и чувствительного метода ОТ-ПЦР, позволяющего проводить массовые исследования для

контроля циркулирующих вариантов вируса ИБК с использованием отечественных реактивов и препаратов.

В связи с вышеизложенным, тема диссертационной работы Серовой Натальи Юрьевны, основная цель которой - 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 вполне 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 исследований.**

Новизна представленной к защите диссертационной работы заключается в том, что диссертантом усовершенствован метод 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.

#### **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, утвержденных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

#### **Содержание работы и достоверность полученных результатов**

Диссертация изложена на 106 страницах печатного текста и состоит из следующих разделов: введение, основная часть, заключение, список сокращений, список литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 24 рисунками и 1 формулой. Список литературы включает 92 источника, из которых 61 зарубежный. В приложении представлены копии документы, подтверждающие практическую значимость работы.

Во введении диссертант излагает степень изученности проблемы, её актуальность, обосновывает выбор темы, для выполнения которой определяется цель и намечаются задачи исследований.



В обзоре литературы на основании материалов отечественных и зарубежных исследователей дана общая характеристика семейства Coronaviridae, особенности заболевания, распространение и пути передачи вируса ИБК, описана структура генома вируса, всесторонне и достаточно полно дана характеристика методов лабораторной диагностики данного заболевания.

В разделе «Собственные исследования» диссертантом изложены материалы, лабораторное оборудование и методы, использованные при получении результатов и их анализе. Представлены подразделы, в которых изложена информация по полученным результатам в соответствии с поставленными задачами. Описаны результаты экспериментальных исследований по разработке тест-систем на основе ОТ-ПЦР с детекцией результатов амплификации методом электрофореза, подбору олигонуклеотидных праймеров использованных для разработки ОТ-ПЦР для выявления генома и дифференциации штаммов и изолятов вируса ИБК. Изложены результаты определения основных характеристик разработанных тест-систем.

Также соискателем проведены эксперименты по выделению изолятов вируса ИБК и изучению эмбрионально-культуральных свойств выделенных изолятов. С помощью разработанных тест-систем на основе ОТ-ПЦР удалось выявлять геном вируса ИБК в пробах патологического материала от больной птицы из различных птицеводческих хозяйств РФ. За период с 2015 по 2017 год соискателем было исследовано 105 проб патологического материала из птицеводческих хозяйств различных регионов РФ с использованием разработанных тест-систем. При этом геном вируса ИБК был выявлен в 25 пробах. Далее, проведено секвенирование и определены первичные нуклеотидные последовательности фрагментов генома нескольких выделенных изолятов, выявленных в ходе скрининговых исследований. Нуклеотидные последовательности варибельной области гена S1 изолятов «RF/12/01», «RF/09/00», «RF/467/16», «ГС-11» депонированы в международной базе данных GenBank.

При изложении разделов «Собственные исследования» и «Обсуждение материала» автор показала свое умение анализировать и обобщать полученные результаты, проводить их сравнение с результатами, опубликованными другими исследователями.

В целом, используемые материалы, примененные методы исследований, объем проведенных экспериментов обеспечивают выполнение поставленных перед диссертантом задач и научное обоснование выводов. Достоверность полученных результатов и выводов вытекает из исследований и не вызывает сомнения.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Сформированные положения и обоснованные экспериментальные данные позволяют использовать в научных учреждениях и в широкой ветеринарной практике предложенные диссертантом методы и схемы диагностических исследований.

Нуклеотидные последовательности фрагментов генома отечественных изолятов вируса ИБК могут быть использованы для дополнения международных баз данных при молекулярно эпизоотологических исследованиях.

Выделенные изоляты вируса ИБК могут быть использованы в учебном процессе и в научно-исследовательской работе.

Основные результаты проведенных исследований доложены и опубликованы в материалах научных конференций: 45 конференции молодых ученых и аспирантов по птицеводству (ВНИТИП, Сергиев Посад, 2002 г.), Международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИВИП (ВНИВИП, Санкт-Петербург-Ломоносов, 14-16 сентября, 2004 г.), «Балтийском форуме ветеринарной медицины и продовольственной безопасности 2016» (Санкт-Петербург, 28-30 сентября 2016 г.), 4-м Международном конгрессе ветеринарных фармакологов и токсикологов «Эффективные и безопасные лекарственные средства» (Санкт-Петербург, 17-19 октября 2016 г.), Международной научно-практической конференции молодых учёных и

специалистов (Екатеринбург, 7-9 июня 2017 г.), а также на заседаниях ученого и методического советов отдела вирусологии и ОБП ВНИВИП в 1999-2002 и 2013-2016 гг.

Диссертация носит экспериментальный характер, в ней профессионально проанализированы результаты опытов. Выводы обоснованы и в целом вытекают из результатов проведенных исследований. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Однако, при детальном ознакомлении с материалами диссертации, возникло несколько замечаний:

1) Ввиду того, что большое сходство физико-химических свойств всех изученных штаммов и изолятов коронавирусов показано разными авторами достаточно давно, непонятен смысл выполнения задачи - «изучить физико-химические свойства изолятов вируса инфекционного бронхита кур». Хотя в разделе «Собственные исследования» в пункте 2.2.3. «Изучение чувствительности изолятов вируса к некоторым химическим и физическим факторам» представлен исчерпывающий оригинальный полученный материал по изучению данных факторов, их актуальная новизна вызывает сомнение.

2) В пунктах «Выделение суммарной РНК», «Обратная транскрипция», «Полимеразная цепная реакция», «Секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей» в разделе «Материалы и методы» указывается сотрудник Бочков Ю.А. с которым диссертант получал данные для выполнения части диссертационной работы. Однако, институт и лаборатория в которой работал этот сотрудник на момент выполнения этой работы (лаборатория вирусных болезней птиц, ФГБУ ВНИИЗЖ), в тексте этого раздела и диссертации в целом, не указаны.

3) В начале раздела «Собственные исследования» на стр. 34 не точно указано, что «все экспериментальные исследования выполнены в отделе вирусологии Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП)». Ведь небольшая часть исследований выполнена совместно с Бочковым Ю.А. на базе лаборатории вирусных болезней птиц (ФГБУ ВНИИЗЖ).

4) В разделе «Собственные исследования» в пункте 2.2.4.2. «Полимеразная цепная реакция» (стр. 60-61) приведены два рисунка - №11 и №12. Значения разведений в подписи к рисункам начинается с  $10^1$ , что лишено смысла (не бывает разведения в десять раз более концентрированного, чем исходный препарат). Правильней обозначить, вместо этого, начальный образец как «исходный», т.е. без разведения.

5) В разделе «Собственные исследования» в пункте 2.2.4.2. «Полимеразная цепная реакция» (стр. 60-61) отсутствуют полученные первичные результаты (электрофореграммы) по оптимизации концентрации ионов магния в реакционной ПЦР-смеси и температуры отжига праймеров при постановке предложенной ОТ-ПЦР.

6) В разделе «Собственные исследования» в пункте 2.2.4.2. «Полимеразная цепная реакция» и пункте 2.2.4.3. «Оценка специфичности и аналитической чувствительности метода» в строгом смысле приводятся разные оценки одного и того же показателя аналитической чувствительности оптимизированного метода: в разделе 2.2.4.2. аналитическая чувствительность приводится в значении выявляемых титр-эквивалентов вируса (менее 1 ЭИД<sub>50</sub>/мл вирусосодержащей суспензии, что является очень хорошим показателем для одностадийной ПЦР), а в разделе 2.2.4.3. этот показатель выражен в количестве молекул РНК генома на миллилитр. Логичней бы было объединить эти показатели в одном разделе и дать их сравнительную оценку, что было бы интересно с практической точки зрения.

7) В разделе «Собственные исследования» в пункте 2.2.4.2. «Полимеразная цепная реакция», пункте 2.2.4.3. «Оценка специфичности и аналитической чувствительности метода», пункте 2.2.4.4. «Оценка возможности использования разработанного метода на основе ОТ-ПЦР для выявления вируса ИБК в полевых пробах», а также в разделе



«Обсуждение материала» отсутствует критический сравнительный анализ преимуществ оригинальной разработанной методики ОТ-ПЦР над аналогичными методиками ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ разработанными и опубликованными ранее другими авторами.

8) Вывод №1 в разделе 3.2 «Выводы» (стр. 79) не является строгим следствием приведенных результатов выявления вируса в нескольких областях РФ, хотя результаты других авторов в известных публикациях подтверждают данный вывод о повсеместном распространении вируса ИБК на территории Российской Федерации.

9) Вывод №8 в разделе 3.2 «Выводы» (стр. 80), о факте депонирования полученных последовательностей фрагментов генома выделенных изолятов вируса ИБК в базе данных GenBank, в строгом смысле, выводом не является. Это скорее часть пункта практического предложения.

10) В целом по тексту диссертации встречаются немногочисленные опечатки и неудачные выражения, не искажающие изложение и обсуждение полученных результатов.

Отмеченные замечания не снижают актуальности полученных результатов, научной и практической значимости работы.

### Заключение

Диссертационная работа Серовой Натальи Юрьевны «Индикация и идентификация изолятов вируса инфекционного бронхита кур, циркулирующих на территории Российской Федерации» является законченной научно-исследовательской работой, по актуальности, новизне и практической значимости отвечает требованиям п.9 Положения ВАК Минобрнауки России «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, 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-  
ведущий научный сотрудник  
референтной лаборатории вирусных  
болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ»,  
кандидат биологических наук

(Email: [andreychuk@arriah.ru](mailto:andreychuk@arriah.ru))

20.10.2017

Подпись Д.Б. Андрейчука заверяю  
Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»  
доктор ветеринарных наук, профессор



Андрейчук  
Дмитрий Борисович

Русалеев  
Владимир Сергеевич