

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора
РАН Косовского Г.Ю. 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. Одним из актуальнейших направлений в настоящее время является создание новых и усовершенствование имеющихся методов выявления носителей инфекционных заболеваний, вызываемых РНК вирусами. Традиционно в этих целях использовали иммунологические методы, диагностируя носительство по присутствию антител к белкам инфекционного агента, однако такой подход, в связи с высокой изменчивостью белков патогена, возможностей транзитной инфекции могут приводить к ложно-отрицательным и ложно-положительным результатам. В этой связи очевидна необходимость перехода к разработкам диагностикумов, основанных на тестировании присутствия генетического материала патогенов. В то же время, диагностика РНК вирусов представляет особую задачу в связи с повышенной нестабильностью РНК. В этой связи очевидна актуальность представленной работы Серовой Н.Ю., посвященной разработкам диагностике инфицированности кур вирусом инфекционного бронхита. 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.

Следует отметить, что разработанные к настоящему времени методы выделения и идентификации вируса ИБК имеют определенные 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 вируса инфекционного бронхита кур, постоянно возникающие новые варианты вируса обуславливают актуальность разработки специфического 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 своем исследовании Н.Ю. Серова в качестве основных выделила 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.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертации.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений определяется правильностью постановки и решения задач по выполнению работы, корректностью постановки экспериментов, использованием протоколов для проведения ОТ-ПЦР, секвенирования и биоинформатического анализа, соответствующих современному методическому уровню, наличия оборудования, необходимому для решения поставленных задач, анализом фактического экспериментального и теоретического материала с использованием необходимых методов для математической обработки полученных экспериментальных данных.

Высказанные автором научные и практические суждения по решению рассматриваемых вопросов аргументированы и вытекают из объёма фактического и экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследований, адекватных целям и задачам работы. При выполнении работы автором использовались методологические подходы, основанные на знании природы и происхождении, структуры, химического состава, морфологических, биологических, физико-химические свойств и проблем экологии вируса инфекционного бронхита кур. Выбор методов исследований и анализ полученных результатов учитывал распространение вируса ИБК, предпочтительные методы выделения вируса ИБК из патологического материала, генетика вируса ИБК исследований.

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. С использованием секвенирования 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 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.

Во введении диссертации изложена степень изученности проблемы, её актуальность, обоснован выбор темы, определены цель и задачи исследования для её выполнения.

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

В разделе «Собственные исследования» диссертантом изложены материалы, лабораторное оборудование, использованные при получении результатов и их анализе. Подробно обсуждаются соответствующие современные методы. Изложение разбито на подразделы, в которых

представлена информация по полученным результатам в соответствии с поставленными задачами.

Автором проведены экспериментальные исследования по выделению изолятов вируса инфекционного бронхита кур, изучению их культивирования на развивающихся эмбрионах кур, рассматривается чувствительность изолятов вируса к некоторым химическим и физическим факторам, эффективность использования получения кДНК участков РНК вируса для выявления инфицированности кур, по сравнительному анализу секвенированных автором последовательностей участков генома ИБК из различных изолятов, а также по филогенетическому анализу полученных автором результатов секвенирования с имеющимися в литературе данными о нуклеотидных последовательностях других изолятов ИБК.

В разделе «Заключение» автор подробно обсуждает полученные им данные, их значение и перспективы использования в решении прикладных задач. Выводы достаточно обоснованы, полностью соответствуют представленным в работе результатам экспериментальных исследований и не вызывают сомнений.

Работа сопровождается списком используемых автором сокращений, словарем и списком цитируемой литературы, оформленными должным образом. Представлен также раздел «Приложение», в который включены, в частности, информация об утвержденных методических положениях, разработанных Серовой Н. Ю., о выявлении ИБК с использованием метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, а также о включении результатов рассматриваемой работы в учебный процесс.

Не смотря на высокую оценку представленной работы, необходимо отметить несколько следующих замечаний.

1. Следовало бы более подробно осветить причины выбора геномного участка ИБК для диагностики инфицированности кур этим возбудителем.

2. Важно было бы акцентировать внимание на оригинальных особенностях выбранного участка генома патогена для диагностики и соответствующих праймеров по сравнению с используемыми другими разработчиками применения ОТ-ПЦР для выявления кур, инфицированных ИБК.

3. Недостаточно подробно рассмотрена организация генома ИБК, так, в рукописи диссертации нет расшифровки обозначений рисунка 10.

4. В рукописи диссертации недостаточно обосновано необходимость исследований по чувствительности изолятов ИБК к органическим растворителям, температуре.

5. Недостаточно обоснованы рекомендации производству по созданию рекомбинаций по участкам S1 гена генетически различных вирусов ИБК.

6. В рукописи встречаются некоторые орфографические, стилистические дефекты (например, на с. 78 рукописи диссертации, предпоследний абзац текста).

Следует отметить, однако, что высказанные замечания не влияют на общую положительную и высокую оценку работы. Необходимо подчеркнуть, что рассматриваемая диссертационная работа является самостоятельным, интересным и завершенным научным исследованием.

Заключение

На основании анализа рукописи диссертации, представленного автореферата, публикаций автора полагаю, что рассматриваемая диссертационная работа Серовой Натальи Юрьевны является самостоятельным и завершенным исследованием. По своей актуальности, уровням и масштабам экспериментальных исследований, теоретического анализа полученных данных, научной новизне и прикладной значимости рассматриваемая диссертационная работа соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (п.9) ВАК России, предъявляемым к диссертациям, представляемым на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология и, соответственно, ее автор заслуживает присуждения ему искомой ученой степени.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук,
профессор РАН



Косовский
Глеб Юрьевич

30.10.2017 г.

Врио директора ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
пушного звероводства и кролиководства имени В.А.Афанасьева»
Почтовый адрес: 140143, Россия, Московская область, Раменский
район, п. Родники, ул. Трудовая, д.6
Тел.: 8(495) 744-26-42, 8(49646) 4-86-81
Электронная почта: niipzk@mail.ru

Подпись Косовского Г.Ю. удостоверяю
Зав. научно-организационным отделом,
кандидат биологических наук



А.Р.Жвакина