



Россельхознадзор

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

улица Гвардейская, дом 6, микрорайон Юрьевец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по НИР
ФГБУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных»

И.А. Чвала

« 6 » апрель 2026 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») на диссертационную работу Ахуновой Алсу Рузалевны на тему «Разработка DIVA-совместимых тест-систем для серологической диагностики классической чумы свиней», представленную в диссертационной совет 35.2.034.01 на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по специальности 4.2.3 - Инфекционные болезни и иммунология животных на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Ахуновой Алсу Рузалевны посвящена комплексному решению актуальной для свиноводческой отрасли проблемы – разработке DIVA-совместимого подхода к конструированию тест-систем для серологической диагностики классической чумы свиней (КЧС). Вспышки КЧС на территории Российской Федерации не регистрируются с 2020 г., чему

предшествовал длительный (с 2007 г.) нисходящий тренд неблагополучия, однако официальный статус зоны, свободной от данного заболевания, должен быть задекларирован Всемирной организацией здравоохранения животных. Для этого необходим полный отказ от вакцинации либо внедрение маркированных (субъединичных либо живых делеционных) вакцин и отсутствие новых вспышек на этом фоне в течение 1 года. Данный порядок регламентируется международной стратегией DIVA (дифференциации инфицированных и вакцинированных животных), что подразумевает внедрение не только маркированных вакцин, но и комплектующих тест-систем, позволяющих дифференцировать поствакцинальные антитела от антител, индуцированных циркулирующими полевыми штаммами. В РФ к настоящему времени коммерчески доступны классические тест-системы, использующие полноразмерный антиген E2 (например, «КЧС-Серотест» (ООО «Ветбиохим»), однако дискриминирующие тесты в ветеринарную практику не внедрены. Создание таких тестов возможно при помощи методов молекулярной вирусологии и генной инженерии. Для решения данных проблем автором диссертационной работы были разработаны методы получения прокариотических аналогов гликопротеинов E2 и E_{gns} вируса КЧС, на основе чего были сконструированы антительный (классический и дискриминирующий) и антигенный иммуноферментные тесты, а также прототип иммунохроматографического теста.

Связь работы с научными программами.

Работа выполнена в ФГБНУ «ФЦТРЕ-ВНИВИ» в период 2023-2025 гг. в соответствии с тематическими темами НИР «Разработка технологии производства рекомбинантной вакцины против классической чумы свиней» (2024 г., рег. № 1023041200040-7), «Разработка технологических подходов к производству современных вакцин против вирусных и бактериальных инфекций животных» (2025-2026 г., рег. № 125040104701-3), «Разработка иммуноферментных тест-систем для серологической диагностики вирусных инфекций свиней и оценки напряженности поствакцинального иммунитета на основе рекомбинантных антигенов» (2025 г., рег. № 125040104700-6).

Отдельные части работы выполнены в рамках гранта грант МСХиП Республики Татарстан № 41-24 НИР «Разработка универсального экспресс-теста для серодиагностики КЧС и оценки напряженности поствакцинального иммунитета» (2024-2025 г.).

Научная новизна исследований.

Научное исследование Ахуновой Алсу Рузалевны посвящено актуальной проблеме – разработке диагностических тестов, направленных на выявление антител против классической чумы свиней, в том числе способных дифференцировать неспецифические антитела против вирусной диареи крупного рогатого скота и дифференцировать вакцинные антитела от эпизоотических. В настоящее время для выявления антител против классической чумы свиней существуют диагностические тесты на основе твердофазного иммуноферментного анализа, однако в нашей стране тестов способных дифференцировать антитела против других пестивирусов и соответствующих стратегии DIVA не разработано. Современная биологическая наука для решения поставленной проблемы описывает подходы, основанные на глубоком и всестороннем биоинформационном анализе. Для решения поставленных задач автор диссертационной работы представила детальный биоинформационный анализ пестивирусных антигенов и использовала в своей работе самые современные и экономически обоснованные методические подходы.

В ходе работы впервые сконструированы оригинальные генетические конструкции, кодирующие модифицированные антигены вируса КЧС. Отличительной особенностью данных антигенов является высокая плотность В-клеточных эпитопов и наличие мотивов основных КЧС-специфических доменов при отсутствии гомологии с другими представителями рода *Pestivirus*.

С использованием данных конструкций получены и депонированы в Государственную коллекцию микроорганизмов штаммы *E. coli* – продуценты рекомбинантных антигенов E2 и Erns.

Для практического применения впервые в РФ разработаны: полуколичественная ИФА-тест-система для контроля качества рекомбинантного вакцинного сырья, а также прототип иммунохроматографического теста (ИХА).

Разработана антительная иммуноферментная тест-система на основе гликопротеина E2 вируса КЧС, а также оценена диагностическая эффективность дискриминирующего ИФА-теста на основе гликопротеина Erns, подтверждающие принципиальную возможность дифференцирования переболевших и традиционно иммунизированных животных (цельновирсионными вакцинами) от животных, иммунизированных только гликопротеином E2 в монорежиме (маркированными вакцинами).

Теоретическая и практическая значимость результатов исследований.

Штаммы *E. coli* – продуценты фрагментов гликопротеина E2 и Erns вируса КЧС депонированы в Отделе – Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и могут быть использованы в производстве ИФА и ИХА тест-систем для диагностики КЧС.

Описанные в диссертационной работе подходы к рекомбинантному синтезу аналогов гликопротеинов вируса КЧС в дальнейшем могут быть использованы в конструировании рекомбинантных субъединичных вакцин.

Результаты проведенных научных исследований использованы при разработке «Набора для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом «КЧС-ИФА» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2025) и «Тест-система «КЧС ИХА»» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2024) на основе рекомбинантных антигенов прокариотического происхождения. Последний позволит оценивать напряженность поствакцинального иммунитета в кратчайшие сроки (3-5 мин) в условиях свиноферм, а также дифференцировать поствакцинальные антитела от антител, индуцированных полевыми штаммами, что совместимо с переходом на рекомбинантные либо живые маркированные вакцины в рамках программы эрадикации КЧС. Применение ИХА-теста может быть также востребовано при экспресс-оценке безопасности (возможность реверсии к патогенному типу) вакцин на основе живых делеционных мутантов.

Разработана и внедрена в лабораторную практику в качестве внутреннего стандарта организации ИФА-тест-система для технологического контроля специфичности рекомбинантного антигена E2, входящего в состав субъединичной вакцины против КЧС, разрабатываемой в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Представленные результаты открывают возможности для гетерологичной экспрессии вирусных антигенов; описанные подходы могут быть применены к процессам получения рекомбинантных антигенов возбудителей других вирусных инфекций свиней. Классический и дифференцирующий варианты ИФА-теста, а также классический моноантигенный вариант ИХА-теста могут применяться в рутинной серодиагностике; чувствительность и специфичность дифференцирующего варианта ИХА-теста могут быть повышены путем использования рекомбинантного аналога Erns эукариотического происхождения. Совокупность разработанных тест-систем может рассматриваться к применению не только в рамках стратегии DIVA, но и для осуществления «диагностики в месте оказания помощи» (Point of care – POC) –

в качестве экспресс-инструментов для незамедлительного принятия решений, следуя универсальной тенденции «точного животноводства».

Степень достоверности научных положений.

По содержанию и изложению диссертация Ахуновой А.Р. соответствует избранному направлению.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» за 2023-2025 гг., на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых аграрных образовательных и научных организаций России (1 этап – ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, 2024 г., 2 этап – ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ», г. Казань, 2024 г., 3 этап – ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина», г. Москва, 2024 г.), на международной научно-практической конференции «Современные проблемы и достижения зооветеринарной науки» (ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ», г. Казань, 2024 г.), на международной научно-практической конференции «Обеспечение технологического суверенитета АПК: подходы, проблемы, решения» (ФГБОУ ВО «УрГАУ», г. Екатеринбург, 2024 г.), на международных научно-практических конференциях «Инновационные решения актуальных вопросов биологической, токсикологической и радиационной безопасности для АПК» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, 2024-2025 г.).

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 4 статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций.

Представленные результаты исследований получены с использованием современной научно-технической базы, их достоверность подтверждается многократными воспроизводимыми экспериментами. Экспериментальные данные статистически достоверны, обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism 7.0» («GraphPad Software Inc.», США), «MedCalc» («MedCalc Software Ltd», Бельгия).

Личный вклад автора.

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Часть научно-исследовательских испытаний проведена и опубликована совместно с другими авторами.

Оценка оформления, содержания, завершенности работы, обоснованности выводов и практических предложений.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, изложена на 153 стр. машинописного текста, включает следующие разделы: введение, обзор

литературы, собственные исследования, обсуждения результатов, заключение, список табличного и иллюстративного материала, список использованной литературы (164 иностранный источник, 49 отечественных источников), а также приложения (нормативно-техническая документация на разработанные тесты). Диссертационная работа включает 26 рисунков и 25 таблиц.

В разделе «Введение» соискателем определены степень актуальности и разработанности заявленной проблемы, сформулированы цель и задачи исследований, обозначены теоретическая и практическая значимость работы, кратко описана методология исследований, даны сведения об апробации результатов исследований, публикациях, структуре работы.

Раздел «Обзор литературы» состоит из 4 подразделов, в которых представлены история распространения КЧС, нозологическая характеристика, морфологическая и геномная характеристики возбудителя, раскрыты аспекты молекулярной эпизоотологии заболевания, описаны подходы к его диагностике и специфической профилактике. В конце приводится заключение по обзору литературы.

В подразделе раздела «Собственные исследования» – «Материалы и методы» автором подробно описываются вирусологические, иммунологические, молекулярно-генетические, биохимические и протеомные методы исследования, примененные в работе, что демонстрирует высокий методический уровень выполнения диссертации. В подразделе «Результаты собственных исследований» автор подробно описывает данные, полученные в ходе выполнения работы. Подробно описан ход выполнения биоинформационного анализа, позволившего идентифицировать в структуре вирусного протеома иммунодоминантные участки (глава 1), далее – обоснованы подходы к прокариотической экспрессии сложных гликопротеинов вируса КЧС (глава 2). Главы 3, 4, 5 посвящены разработке и валидации антигенного ИФА, антительного ИФА и антительного ИХА соответственно.

В разделе «Обсуждение результатов» представлен подробный анализ собственных исследований. В разделе «Заключение» приведено 6 аргументированных выводов в соответствии с поставленными задачами. В разделе «Практические рекомендации» выделены основные тезисы для дальнейшего использования полученных результатов в лабораторной практике, в частности, предлагается внедрить описанные в работе подходы к рекомбинантному синтезу антигенов в процессы конструирования рекомбинантных субъединичных вакцин против КЧС.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует паспорту специальности 4.2.3 – Инфекционные болезни и иммунология животных по пунктам 4. «Генетика, селекция, культивирование микроорганизмов, разработка, стандартизация, технология и контроль производства иммунобиопрепаратов (вакцин, сывороток, диагностических тест-систем)», 7. «Диагностика инфекционных болезней животных (эпизоотологическая, клиническая, патоморфологическая, серологическая, молекулярная), индикация патогенных микроорганизмов» и 19. «Иммунология животных, противoinфекционный иммунитет, фундаментальные основы иммунопрофилактики, иммунопатология, иммунодефициты, иммунологический анализ в эпизоотологии, серология, серопротекция, серотерапия животных».

В ходе ознакомления с работой возникли следующие вопросы и замечания:

- Какова стабильность получаемых белков при хранении в растворе и в иммобилизованном состоянии?

- Тема диссертационной работы заявлена как разработка тест-систем для возможности их использования в серологической DIVA диагностике КЧС. В ходе проведенных автором исследований разработана только ИФА тест-система на основе гликопротеина E2, аналогичная другим представленным на российском рынке, как отечественного так и импортного производства. При этом в работе не отражены данные о сравнении её качественных характеристик с аналогами.

- Разработанная соискателем тест-система «Набор для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом «КЧС-ИФА» безусловно может иметь значение в оценке поствакцинального иммунного ответа. Однако перспективы использования данной тест-системы для диагностики КЧС в настоящий момент в России сомнительны. Из-за массовой иммунизации свиней живыми немаркированными вакцинами (по данным «Центра ветеринарии», в Российской Федерации ежегодно проводится более 90 млн вакцинаций против КЧС) ни один серологический метод не позволяет установить диагноз.

- В связи с вышесказанным, ключевым методом диагностики КЧС в России на сегодняшний день является метод ОТ-ПЦР, недостатки которого описаны соискателем в разделе «Обзор литературы» некорректно. Соискатель утверждает, что «ОТ-ПЦР в реальном времени широко используется для выявления вирусного агента в дифференциальной диагностике», хотя ПЦР выявляет геном вируса, а не инфекционно-активные частицы. Что означает «дифференциальная диагностика» в данном контексте? ПЦР используется как

референтный высокочувствительный метод диагностики КЧС, а в современных реалиях нашей страны является де-факто ключевым звеном в мониторинге данной болезни.

Далее соискатель заявляет, что «недостатками ОТ-ПЦР в реальном времени являются высокая стоимость и сложность из-за одновременного термоциклирования и флуоресцентного обнаружения», хотя стоимость ПЦР-реакции незначительно превышает ИФА, а «одновременное циклирование и флуоресцентное обнаружение» - это сущность реакции, а не её сложность. Также соискатель указывает недостатком ПЦР «возможный неправильный дизайн олигонуклеотидов, не учитывающий гомологию с ВД КРС», что не соответствует действительности, так как все ПЦР-тест-системы перед их реализацией проходят процедуру валидации, в рамках которой в обязательном порядке определяется в т.ч. её специфичность, учитывающая возможные перекрестные реакции с другими пестивирусами.

- В настоящее время единственной зарегистрированной маркированной вакциной против КЧС в России является «ВЕРРЕС-КЧС-Е2» (производитель ООО «Ветбиохим»), которая ни разу не упомянута соискателем в тексте диссертации. В связи с чем возникает вопрос – на кого рассчитаны разработанные дифференцирующие серологические методы, учитывая тотальную иммунизацию свиней в Российской Федерации с использованием живых вакцин?

- В каком временном интервал можно ожидать появление на рынке разработанных тест-систем?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Ахуновой Алсу Рузалевны на тему: «Разработка DIVA-совместимых тест-систем для серологической диагностики классической чумы свиней» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований предложены решения актуальной научной проблемы по повышению качества серологической диагностики классической чумы свиней.

Считаем, что диссертационная работа выполнена на актуальную тему, на современном методологическом уровне, содержит значительный объем исследований, обладает новизной и научно-практической значимостью. Работа полностью соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (с изм. от 16 октября 2024 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Ахунова Алсу Рузалевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата

ветеринарных наук по специальности 4.2.3 - Инфекционные болезни и иммунология животных.

Отзыв заслушан, рассмотрен и одобрен на расширенном заседании лаборатории молекулярных и генетических исследований, а также референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (Протокол №1 от 03.04.2026 г.).

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Информационно-аналитического центра Управления ветнадзора ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»	 Константин Николаевич Груздев
Доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных и генетических исследований ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»	 Александр Владимирович Спрыгин
кандидат ветеринарных наук, заместитель руководителя центра-заведующий референтной лабораторией по АЧС ЛДЦ ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»	 Алексей Сергеевич Иголкин
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории по АЧС ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»	 Роман Сергеевич Чернышев
Подписи доктора биологических наук, профессора Груздева Константина Николаевича, доктора биологических наук Спрыгина Александра Владимировича, кандидата ветеринарных наук Иголкина Алексея Сергеевича, кандидата биологических наук Чернышева Романа Сергеевича заверяю:	
Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ» кандидат биологических наук, доцент	 Л.Б. Прохватилова

06.04.2026г

(600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ул. Гвардейская, д. 6
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»),
тел. +7 (4922) 26-19-88, адреса электронной почты: gruzdev@arriah.ru; sprygin@arriah.ru;
igolkin_as@arriah.ru; chernishev_rs@arriah.ru)