

## ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук  
Алексеева Константина Петровича на диссертационную работу  
Ахуновой Алсу Рузалеовны на тему: «Разработка DIVA-совместимых тест-  
систем для серологической диагностики классической чумы свиней»,  
представленную к защите в диссертационный совет 35.2.034.01 на базе  
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет  
ветеринарной медицины» на соискание учёной степени кандидата  
ветеринарных наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и  
иммунология животных

### **Актуальность темы.**

Представленная диссертация посвящена актуальной проблеме – разработке DIVA-совместимых тест-систем для диагностики классической чумы свиней (КЧС). Работа является своевременной и практически значимой, особенно в свете необходимости сопровождения маркированных вакцин адекватными диагностическими средствами, в том числе способных дифференцировать неспецифические антитела против вирусной диареи крупного рогатого скота (ВД КРС) и дифференцировать вакцинные антитела от эпизоотических.

К настоящему времени свиноводческая отрасль в Российской Федерации эволюционировала в высокоэффективную индустрию, работающую по самым современным мировым стандартам, Россия входит в четверку мировых лидеров по производству свинины. Крупные агрохолдинги не только полностью обеспечили потребности внутреннего рынка, но и готовы экспортировать свинину в другие страны. На этом фоне, в свете требований, предъявляемых к продукции свиноводства в международной торговле, есть запрос от отрасли на создание DIVA-совместимых вакцин и сопровождающих их тест систем. И если рекомбинантная маркированная вакцина против КЧС уже разработана и зарегистрирована, сопровождающие тест-системы отечественного производства до сих пор не были разработаны. Это еще раз подчеркивает высокую востребованность работы Алсу Рузалеовны, ее своевременность и высокую практическую значимость.

В настоящее время для выявления антител против КЧС 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 биоинформационный анализ пестивирусных антигенов и использовала в работе современные и всесторонне обоснованные методические подходы.

Ахуновой Алсу Рузалевной получены следующие результаты: – получены рекомбинантные штаммы *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2 и BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns, экспрессирующие усеченные фрагменты антигенов вируса КЧС E2 и Erns богатые В-клеточными эпитопами, что позволяет применять их для серологической диагностики КЧС;

– разработана и валидирована иммуноферментная тест-система для полуколичественного определения антигена вируса КЧС, направленная на технологический контроль соответствующего вакцинного сырья;

– разработана и валидирована иммуноферментная тест-система на основе антигена E2 вируса КЧС и дифференцирующий тест на основе белка Erns вируса КЧС для выявления соответствующих антител;

– разработан иммунохроматографический тест на основе антигенов E2 и Erns позволяющий оценить напряженность поствакцинального иммунитета и установить возможное инфицирование вирусом классической чумы свиней.

### **Оценка содержания диссертационного исследования.**

Введение. Актуальность представленной диссертационной работы достаточно обоснована и хорошо описана.

В обзоре литературы описаны данные относительно истории распространения вируса КЧС, его морфологии, молекулярной эпизоотологии, представлены диагностические аспекты дифференциации пестивирусов и основные технологические методы контроля вакцинного сырья. Глава читается с интересом, она отражает глубокие знания автора изучаемой проблемы. Не смотря на в целом завершенный, подробный характер раздела, по его содержанию есть замечания, которые будут подробно изложены ниже.

Раздел «Собственные исследования» состоит из двух элементов:

2.1 Материалы и методы;

2.2 Результаты и собственных исследований.

Следует отметить тщательность проработки методической части: в разделе «Материалы и методы» подробно охарактеризованы объекты, условия

и этапы исследований, что не оставляет сомнений в корректности полученных данных. Замечаний по представленному материалу нет.

В разделе 2.2 изложены результаты собственных исследований. Раздел разделён на 5 подразделов. Раздел написан грамотно, в хронологическом порядке (по этапам исследований, позволяющих разработать создаваемые диагностические тесты), описанные результаты представлены, в целом, с указанием достаточной доказательной базы, позволяющей утверждать о полном выполнении поставленных перед диссертантом задач.

В ходе анализа представленных результатов исследования критических замечаний, влияющих на правильность интерпретации результатов исследования не установлено, однако есть несколько существенных предложений, следование которым могло бы представить работу технически в наиболее завершённом, последовательном виде с точки зрения логики изложения результатов.

Выводы отражают основные положения диссертации, написаны четко в соответствии с поставленными задачами.

#### **Степень достоверности и апробация работы.**

Обоснованность и достоверность полученных выводов, сформулированных предложений и рекомендаций не вызывает сомнений, определяется правильностью постановки и решения задач по выполнению работы, использованием соответствующего методического уровня и оборудования для проведения экспериментов, анализом фактического экспериментального и теоретического материала.

Диссертационная работа выстроена согласно цели и задачам исследования и включает в себя применение биоинформационных (анализ геномов и протеомов эпизоотических штаммов и изолятов, поиск иммуногенных эпитопов, *in silico* оценка антигенности кандидатных пептидов и др.), молекулярно-генетических и генно-инженерных (клонирование генов, секвенирование ДНК, получение и трансформация компетентных клеток, оптимизация условий индукции экспрессии и др.), вирусологических (культивирование вируса *in vivo*, титрование вируса, инфицирование культур клеток и др.), протеомных (белковый электрофорез, масс-спектрометрический анализ, ионообменная и металл-хелатная хроматография), серологических (иммуноферментный и иммунохроматографический анализы), биохимических (получение специфических антисывороток, пероксидазных конъюгатов и конъюгатов с наночастицами золота и др.) методов исследования, а также статистического анализа.

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, на международных научно-практических конференциях.

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

### **Научная новизна работы.**

Впервые на основе биоинформационного анализа и данных об эпитопной структуре гликопротеинов E2 и Erns вируса КЧС сконструированы усечённые пептиды указанных белков, из которых исключены фрагменты, содержащие эпитопы, гомологичные другим представителям рода *Pestivirus*. Это позволило обеспечить высокую специфичность рекомбинантных антигенов в серологических реакциях, исключаящую перекрёстное реагирование с антителами к ВД КРС и пограничной болезни овец (ПБО).

Получены рекомбинантные штаммы *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2 и BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns, обеспечивающие эффективную экспрессию целевых пептидов в прокариотической системе. Впервые показана возможность использования данных рекомбинантных антигенов, полученных в *E. coli*, для одновременной сорбции в иммуноферментном анализе и в составе иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для DIVA-дифференциации инфицированных и вакцинированных животных.

Разработан набор для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом «КЧС-ИФА» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2025) на основе рекомбинантного антигена E2 и тест-система на основе гликопротеина Erns, соответствующей стратегии DIVA.

Разработана тест-система «КЧС ИХА» (ТУ 21.10.60-009-00492374-2024) в кассетном формате, в котором впервые реализована схема, использующая иммобилизацию антигенов E2 и Erns для специфического выявления антител к вирусу КЧС. Данная тест-система 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.

Совокупность полученных результатов представляет собой новое решение актуальной задачи – создания отечественных DIVA-совместимых

диагностических средств для контроля вируса КЧС, отвечающих современным требованиям специфичности и технологичности.

### **Научно-практическая значимость работы.**

Научная значимость работы заключается в развитии методологических подходов к конструированию рекомбинантных антигенов для дифференциальной серодиагностики КЧС. Получены новые рекомбинантные штаммы-продуценты *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a/E2 и BL21(DE3)pLysS/pET28a/Erns, что расширяет арсенал доступных антигенов для конструирования диагностических препаратов.

Практическая значимость работы определяется созданием конкретных диагностических средств, соответствующих современным требованиям эпизоотологического мониторинга и контроля КЧС.

Разработан и зарегистрирован в установленном порядке набор для определения антител к вирусу классической чумы свиней иммуноферментным методом «КЧС-ИФА», позволяющий дифференцировать поствакцинальный иммунитет от постинфекционного и может быть использован при проведении мониторинговых исследований, а также для контроля благополучия хозяйств.

Разработана тест-система «КЧС ИХА», применение которой может в кратчайшие сроки установить иммунологический статус свиней по КЧС (вакцинированные или переболевшие) при возникновении сложных ситуаций во время вспышек КЧС, и которая может быть также востребована при экспорте или импорте свиней.

Разработанные диагностические препараты могут быть использованы для сопровождения маркированных вакцин против КЧС, в том числе зарегистрированной в Российской Федерации вакцины «ВЕРРЕС-КЧС-Е2», что обеспечивает возможность реализации стратегии DIVA, направленной на искоренение болезни с сохранением здорового поголовья. Эта задача на сегодняшний день является настолько востребованной и приоритетной, что одного только этого аспекта достаточно для утверждения актуальности и практической значимости работы.

Результаты диссертационной работы и могут быть использованы в научно-исследовательских учреждениях, ветеринарных лабораториях и на биотехнологических предприятиях, занимающихся производством диагностических препаратов.

## **Оценка содержания, завершенность работы и качество ее содержания.**

Прежде чем переходить к недостаткам работы, хотелось бы отметить высокое качество написания диссертации. Сейчас не часто встречаются работы, написанные таким хорошим русским языком, объединенные четкой внутренней логикой изложения, читать которые легко и приятно. Видно, что над текстом очень тщательно поработали, работать с текстом диссертации легко и приятно.

В целом исследование выполнено на высоком методическом уровне, основные результаты имеют очевидную перспективу внедрения. Вместе с тем при ознакомлении с текстом диссертации возник ряд замечаний и вопросов, которые можно сгруппировать следующим образом.

1. Недостатки в подборе и использовании литературных источников. В обзоре литературы в восемнадцати местах встречаются ссылки, которые не полностью подтверждают приведённые в тексте утверждения или, в редких случаях, вообще не соответствуют утверждениям автора. Последнее встречается в тексте буквально пару раз и скорее всего связано с форматированием пространного списка источников (в диссертации их 213), возможно это случайные остатки нумерации из предыдущих редакций. Остальные случаи можно описать или как использование общего характера работ для иллюстрации очень узко-специальных тезисов автора, для которых существует не мало специальной литературы. В части случаев, напротив, самые общие утверждения иллюстрируются узко-специальной публикацией, хотя уместнее было бы сослаться на *Fields Virology* или аналогичные справочного рода источники. И есть случаи, когда тезисы автора по узко-специальным аспектам сопровождаются ссылками на источник по другим узко-специальным аспектам.

2. В обзоре литературы недостаточно подробно раскрыты ключевые для работы аспекты: стратегия DIVA и существующие подходы к её реализации (следовало бы упомянуть коммерческие маркированные вакцины, например «Suvaxyn CSF Marker», «ВЕРРЕС-КЧС-Е2»), антигенная структура белков E2 и Erns, локализация уникальных и перекрёстно реагирующих эпитопов. Эти сведения частично вынесены в раздел собственных результатов (стр. 55-57), что перегружает его литературными данными в ущерб изложению собственных разработок. Работы смотрелась бы еще более завершенной, если бы раздел «Обзор литературы» содержал две дополнительные главы, одна из которых посвящена стратегии DIVA, вторая — антигенной структуре E2 и серологическому перекресту пестивирусов. Кроме того, в рамках стратегии DIVA в обзоре литературы стоило бы упомянуть альтернативную концепцию

создания дискриминирующих тест систем, в том числе в аспекте отсутствия перекреста с другими пестивирусами — а именно, использование моноклональных антител для диагностики КЧС. Это хорошо проработанная тема, и хотя непосредственно к работе диссертанта она отношения не имеет, рассмотреть все альтернативные подходы в обзоре литературы было бы полезно.

3. Самым существенным замечанием по изложению результатов и их интерпретации является пробел в описании получения уникальных, не имеющих перекреста с другими пестивирусами, собранных из отдельных эпитопов химерных полипептидов. В разделе 2.2.1 (дизайн рекомбинантных белков) отсутствует ключевая информация о том, на основании каких соображений были сконструированы усечённые пептиды. Из каких эпитопов они собраны, какие фрагменты исключены для устранения перекрёстной реактивности? Какие рациональные соображения стоят за тем, что в структуре E2 оставлен ТМ-домен? Почему не были использованы дополнительные охарактеризованные домены, увеличивающие растворимость, снижающие агрегацию белков, либо имеющие иммуномодулирующие свойства (такие как декстран- или холин-связывающий домен или другие)

4. При ознакомлении с разделом «Результаты», указанные в п.3 недостатки усугубляются комбинацией случайных ошибок или неточностей в таблицах 16 и 17. В результате складывается впечатление, что эти таблицы и рисунок 12 противоречат друг другу, давая три версии строения и молекулярной массы рекомбинантных полипептидов. По мере дальнейшего ознакомления с текстом картина проясняется и становится понятно, что у таблицы 16 не совсем корректное название, а в таблице 17 опечатка.

5. Необходимо уточнить, каким образом осуществлялась оптимизация кодонов и GC-состава: была ли она детально прописана автором в техническом задании при заключении договора с ЗАО «Евроген», либо же данная услуга была выполнена сотрудниками компании в рамках стандартного протокола по заказу синтеза генов «под прокариотическую систему экспрессии» без детализированного ТЗ? Известно, что ЗАО «Евроген» предлагает такую услугу, как оптимизация кодонов под системы экспрессии, и прочие подходы к оптимизации синтетической ДНК, однако ряд исследователей предпочитают полностью самостоятельный дизайн конструкций. В этой ситуации в диссертации необходимо указать, кем была выполнена работа по оптимизации кодонов, GC-состава и вторичной структуры ДНК.

6. В разделе 2.2.3 указано «Совокупность данных подтверждает наше предположение о том, что рекомбинантный E2 экспрессируется

преимущественно в клеточную цитоплазму в нерастворимом состоянии и частично – во внешнюю среду.». А не может ли быть что незначительное количество E2 в культуральной среде связано с незначительной гибелью и разрушением клеток в процессе культивирования?

7. В разделе 2.2.5 указано «Для преодоления данного ограничения необходимо заменить антиген Erns рекомбинантным аналогом эукариотического происхождения». Однако из текста не ясно, чем обусловлен такой вывод, учитывая, что рекомбинантный антиген E2, полученный в прокариотической системе, продемонстрировал высокую эффективность. Требуется дополнительное обоснование целесообразности замены именно для Erns.

8. Присутствуют отдельные стилистические и терминологические погрешности. В тексте встречаются неудачные или непонятные формулировки, например: «С-конец основного белка, который расщепляется на своем собственном карбоксильном конце» (стр. 20) и т.д.

Несмотря на перечисленные замечания, диссертационная работа производит в целом положительное впечатление. Отдельные неточности в формулировках, отмеченные в отзыве, носят единичный характер и не влияют на общее высокое качество изложения материала.

### **Заключение.**

Диссертация Ахуновой Алсу Рузалевны «Разработка DIVA-совместимых тест-систем для серологической диагностики классической чумы свиней» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой изложены новые результаты разработки и совершенствования методов серодиагностики классической чумы свиней.

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

Работа заслуживает положительной оценки с точки зрения литературного оформления. Текст вычитан внимательно, логически выстроен, не содержит незавершённых или стилистически неотработанных фрагментов. Отдельные неточности в формулировках, отмеченные в отзыве, носят единичный характер и не влияют на общее высокое качество изложения материала. Несмотря на перечисленные замечания, диссертационная работа производит в целом положительное впечатление.

Диссертационная работа по актуальности, теоретической и практической значимости, а также по объему проведенных исследований полностью

соответствуют требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 года №426), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Ахунова Алсу Рузалева, несомненно заслуживает присуждения степени кандидата ветеринарных наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных.

**Официальный оппонент:**

главный специалист по новым технологиям, ООО «Ветбиохим»,  
кандидат биологических наук  
30.03.2026

Алексеев Константин Петрович

Подпись кандидата биологических наук Алексеева Константина Петрович заверяю:

Начальник отдела кадров

ООО «Ветбиохим»



Саркисова Ирина Викторовна

Общество с ограниченной ответственностью «Ветбиохим» (ООО «Ветбиохим»), 109316, г. Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Печатники, пр-кт Волгоградский, д. 42, этаж 12, ком. 12., тел: +7(495)640-1714, e-mail: [info@vetbio.ru](mailto:info@vetbio.ru)