

Председателю диссертационного  
совета Д 220.038.07 на базе  
ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ  
А.Ю. Шантыз

### Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе Дмитриева Константина Юрьевича на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа», представленной на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология с микологией и микотоксикологией и иммунология.


Фамилия, имя, Отчество	Афонюшкин Василий Николаевич
Адрес, телефон, эл. почта	620075, Россия, г. Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42 Тел.:8-(922)-107-67-92 e-mail: evshackih@yandex.ru
Гражданство	РФ
Ученая степень (с указанием специальности научных работников, по которой защищена диссертация)	Кандидат биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология с микологией и микотоксикологией и иммунология.
Ученое звание	-
<b>Основное место работы:</b>	
Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН)
Должность	Заведующий сектором молекулярной биологии
<b>Направления научной работы:</b> разработка и применение методов молекулярной диагностики инфекционных болезней животных и птиц, эпизоотология, патологическая гистология и биохимия болезней с.-х. птицы.	
<b>Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет</b>	
1. Черепушкина В.С., Миронова Т.Е., Балыбина Н.Ю., Донченко Н.А., Коптев В.Ю., Афонюшкин В.Н., Мишукова О.В., Филипенко М.Л. Изучение эффективности детектирования медиаторов чувства кворума <i>P. aeruginosa</i> с использованием биосенсоров IGEM//Ветеринария и кормление. 2019. № 7. С. 36-38.	
2. Соколова Е.А., Филипенко М.Л., Воронина Е.Н., Барсукова М.А., Донченко Н.А., Афонюшкин В.Н., Шеманаев С.А. Изучение частот однонуклеотидного полиморфизма ser638arg гена CAST у свиней кросса PIC//Ветеринария и кормление. 2019. № 7. С. 6-8.	
3. Afonyushkin V.N., Kozlova Y.N., Tromenshleger I.N., Filipenko M.L., Novikova O.B. Comparative characteristics of discrimination of <i>S. enterica</i> isolates by phagotyping test and dienes test// Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2018. Т. 164. № 6. С. 790-793.	



4. Афонюшкин В.Н., Донченко Н.А., Козлова Ю.Н., Давыдова Н.А., Черепушкина В.С., Фролова О.А. Изучение влияния цитринина на возникновение дисбактериоза и полирезистентности микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae//Ветеринарный врач. 2018. № 6. С. 35-39.
5. Afonyushkin V.N., Kechin A.A., Tromenshleger I.N., Filipenko M.L., Smetanina M.A. Determination of cell concentrations in stationary growing *Lactobacillus salivarius* cultures in relation to formation of biofilms and cell aggregates//Microbiology (Mikrobiologiya). 2017. Т. 86. № 6. С. 793-798.  
Afonyushkin V.N., Dudareva E.V., Tromenshleger I.N., Filipenko M.L., Khrapov E.A. Antagonistic activity of intestinal lactobacteria from domestic fowl against clinical isolates of *Salmonella enteric*// Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2016. Т. 161. № 6. С. 801-803.
6. Афонюшкин В.Н., Аксенов А.Н., Филипенко М.Л. Обнаружение антител к флавивирусам у бройлеров с пониженной продуктивностью// Ветеринария. 2015. № 12. С. 24-27.
7. Афонюшкин В.Н., Давыдова Н.В., Троменшлегер И.Н., Мишукова О.В., Козлова Ю.Н., Черепушкина В.С., Миронова Т.Е., Клемешова И.Ю. Зависимость уровня инфицированности сальмонеллами в популяциях кур от антагонистической активности Lactobacillaceae и Enterococcaceae в отношении *Salmonella enterica* Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). 2020. № 1 (54). С. 48-55.
8. Рябчикова Е.И., Филипенко М.Л., Афонюшкин В.Н., Хоменко Ю.С. К вопросу о роли электронной микроскопии в своевременном выявлении новых инфекций кур и свиней //Ветеринария. 2020. № 2. С. 27-31.
9. Афонюшкин В.Н., Донченко Н.А., Козлова Ю.Н., Давыдова Н.В., Коптев В.Ю., Черепушкина В.С. Роль биоплёнок в адаптации микроорганизмовк неблагоприятным факторам окружающей среды на примере *Pseudomonas aeruginosa* //Гигиена и санитария. 2020. Т. 99. № 4. С. 379-383.

Заведующий сектором молекулярной  
биологии Сибирского федерального  
научного центра

агробиотехнологий РАН, к.б.н.

 Афонюшкин Василий Николаевич

Подпись В.Н.Афонюшкина заверяю:

Ученый секретарь СФНЦА РАН,

канд. с.-х. наук

 Ирина Николаевна Минина



## ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук, Афонюшкина Василия Николаевича, на диссертационную работу Дмитриева Константина Юрьевича «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа», представленную в диссертационный совет Д 220.038.07 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Актуальность темы диссертации.** В последние годы в России наблюдается значительный рост продаж утиного мяса, что связано с появлением крупных утководческих хозяйств. На ограниченной территории происходит сосредоточение большого поголовья разновозрастных групп птицы и постоянный приток новых партий суточного молодняка создает риск возникновения эпизоотий вирусного гепатита утят типа 1.

Вирусный гепатит утят типа 1 (ВГУ-1) – особо опасная инфекционная болезнь, характеризующаяся острым течением с преимущественным поражением печени, высокой смертностью утят до 6-недельного возраста. Широкое распространение ВГУ-1 в России и в мире обусловлено длительной персистенцией возбудителя в организме переболевшей птицы, его генетической вариабельностью, а также стационарным характером болезни.

Болезнь часто протекает в ассоциации с инфекциями вирусной и бактериальной этиологии, поэтому основой успешной борьбы с болезнью



является лабораторная диагностика, в том числе с использованием методов серологической диагностики.

Среди серологических методов для определения уровня антител в пробах сыворотки крови уток широко используют реакцию нейтрализации, которая обладает высокой специфичностью. Однако данная реакция является длительной и методически трудоемкой и не всегда удобна для исследования большого количества проб.

В настоящее время для контроля уровня иммунного ответа многие исследователи успешно используют метод иммуноферментного анализа (ИФА). Данный метод обладает специфичностью, высокой чувствительностью и в сочетании с быстротой анализа дает ему неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами. Метод позволяет автоматизировать процессы постановки реакции и одновременно исследовать большое количество проб при компьютерной обработке результатов.

Своевременная диагностика ВГУ-1 является основой купирования инфекции в первичном очаге и разработки профилактических и противоэпизоотических мероприятий. Учитывая очевидную перспективность иммуноферментного анализа, разработка высокочувствительного и специфичного метода для проведения ретроспективной диагностики и оценки поствакцинального иммунного ответа является актуальной.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Диссертантом проведен анализ литературы по проблеме диагностики вирусного гепатита утят типа 1, на основании которого были определены цель и задачи исследований. Научные положения, выводы и практические предложения, сформулированные в диссертационной работе Дмитриева Константина Юрьевича, соответствуют поставленным цели и задачам, обоснованы фактическим материалом, включающим большой объем экспериментальных исследований с применением методик, соответствующих современному уровню развития науки. Иммуноферментная тест-система для

серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 апробирована в производственных условиях на базе ООО «Племзавод Благоварский», что подтверждает возможность ее практического применения.

**Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.** Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц им. академика Коровина Р.Н. Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП) – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН в период с 2016 по 2018 годы в соответствии с научно-технической программой НИР № 0599-2014-0221. Соисполнителями в работе по получению антивидовых иммунопероксидазных конъюгатов, специфичных к IgG уток, были сотрудники ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как исследования проведены на большом фактическом материале с использованием современных методов исследований, статистически обработаны и испытаны в производственных условиях. Результаты исследований представлены в таблицах и рисунках. Материалы диссертации отражены в 8 научных работах, из которых 2 опубликованы в изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденный ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП и Ученого совета ВНИВИП (2016-2018), Международной научно-практической конференции «Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования» (Москва, 2017), Международной научно-практической конференции: «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке» (Смоленск, 2018), Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве» (г. Екатеринбург).

2018), научно-практической конференции «Современные подходы и перспективы решения актуальных зооветеринарных проблем в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к антигену ВГУ-1; отработан метод концентрирования и очистки вируса гепатита утят типа 1 из аллантоисной вирусосодержащей жидкости, разработана схема получения высокоактивной специфической и антивидовой сыворотки для ИФА; получен активный, специфичный и стабильный при хранении в жидком состоянии антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG уток; оптимизированы параметры проведения иммуноферментного анализа по иммуноспецифическим и неспецифическим компонентам тест-системы; проведены сравнительные исследования по определению специфических антител в сыворотке крови в иммуноферментном анализе и в реакции нейтрализации и установлена высокая корреляция их значений.

**Значимость для науки и практики проведенной соискателем работы** заключается в разработке иммуноферментной тест-системы, которая показала высокую чувствительность и специфичность при изучении динамики формирования антител у вакцинированных утят в экспериментальных условиях и поствакцинального иммуногенеза у уток в производственных условиях. На основе полученных результатов разработаны Методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа 1» от 25. 01. 2016 г. и «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа» от 28. 08. 2018 г. рекомендованные для использования ветеринарными специалистами региональных, областных, зональных и специализированных лабораторий и сотрудниками научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля, а также получено Решение о выдаче патента на

изобретение «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» от 19.02.2019 г. (заявка № 2018117226/15(026852).

**Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению диссертации.** Диссертационная работа Дмитриева К.Ю. изложена на 107 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; собственные исследования, включающие материалы и методы, результаты исследований; обсуждение результатов; выводы; практические предложения; список литературы; список сокращений и приложение. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами, 6 рисунками и 3 формулами, которые наглядно отражают результаты проведенных исследований. Список литературы включает 151 источник, из которых 82 - зарубежные.

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследований, показаны новизна, теоретическая и практическая значимость работы, из которых логически вытекают положения, выносимые на защиту. В разделе также отражены методология и методы исследований, степень достоверности и апробация результатов, личное участие соискателя, публикации результатов исследований и структура диссертации.

Раздел «Обзор литературы» содержит сведения об эпизоотической ситуации, распространении вирусного гепатита утят типа 1, причиняемом экономическом ущербе. В разделе дана характеристика возбудителя болезни, описаны клинические и патоморфологические признаки, изложены аспекты иммунопрофилактики и диагностики. Отдельная глава посвящена иммуноферментному анализу, преимуществам и недостаткам его вариантов, сравнению с другими серологическими методами, перспективам использования данного метода. Обзор литературы имеет заключение и в целом отражает современное состояние проблемы. Изучение и анализ сведений, представленных в литературных источниках отечественных и

зарубежных исследователей, позволили автору диссертационной работы обосновать актуальность, новизну работы, ее цель и задачи.

Глава «Собственные исследования» включает разделы «Материалы и методы исследований» и «Результаты собственных исследований».

В разделе 2.1. «Материалы и методы исследований» описаны объекты исследований, перечислены используемые в процессе проведения исследований среды, растворы, реактивы и пр. материалы, оборудование и приборы. В разделе дано краткое описание методов и методик исследований, которые соответствуют действующей нормативной документации и позволяют получать в ходе исследований достоверные результаты.

В разделе 2.2. «Результаты собственных исследований» изложены ход проведения и результаты исследований, проведенных соискателем. Результаты исследований представлены в соответствии с целью работы и поставленными задачами, иллюстрированы 14 таблицами, 6 рисунками и 3 формулами. Раздел разделен на 3 основных подраздела.

В подразделе 2.2.1. «Получение иммуноспецифических компонентов для иммуноферментного анализа» представлены данные, собранные в ходе получения иммуноспецифических компонентов для ИФА, вирусосодержащего материала, очищенного антигена вируса гепатита утят типа 1, специфической сыворотки крови к вирусу гепатита утят, антивидовой сыворотки, иммунопероксидазного конъюгата, а также данные по инактивации вируса гепатита утят и контролю иммунопероксидазного конъюгата.

В подразделе 2.2.2. представлены результаты разработки иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1, в том числе данные по определению оптимальных концентраций и условий взаимодействия компонентов тест-системы, по расчету титра антител по одному разведению, по оценке чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы.



Подраздел 2.2.3. посвящен результатам исследований, полученным в ходе апробации иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1, которые включают данные по динамике формирования антител у вакцинированных птиц в лабораторных и производственных условиях, а также данные по продолжительности материнского иммунитета против вирусного гепатита утят в производственных условиях.

В главе 3. «Обсуждение результатов исследований» проведен сравнительный анализ литературных данных и результатов исследований, полученных в ходе проведения работы.

В главе 4 подведены итоги проведенной работы, которые представлены в виде выводов и практических предложений. Выводы вытекают из поставленных задач и соответствуют тематике диссертационной работы. В выводах отражены основные результаты проведенных исследований, на основе которых сформулированы практические предложения.

Диссертационная работа завершена списком сокращений, списком использованной литературы и приложением. В Приложении представлены документы, подтверждающие разработки и их внедрение (копии методических рекомендаций, справки о внедрении и др.). Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертационной работы.

#### **Замечания, вопросы и предложения по диссертации.**

При общей положительной оценке работы Дмитриева Константина Юрьевича имеются некоторые замечания и вопросы, на которые хотелось бы получить ответы и разъяснения:

1. В работе не указано, как контролируется идентичность штамма используемого для получения антигена. Из собственного опыта, могу заметить, что культуры штаммов вирусов, хранящихся длительное время, не

всегда бывают однородны, возможно, заражение эмбрионов и культур клеток посторонними вирусными агентами. Существуют ли какие-то методы контроля этих рисков в технологии производства ИФА системы?

2. Эмбрионы используемые в работе получены от SPF птицы?

3. Помимо вируса гепатита уток типа 1, в научной литературе встречается упоминание и, так называемых, вариантных, штаммов (DHV 1a). Насколько вероятно выявление антител у уток инфицированных данной группой вирусов? В литературном обзоре упоминания об этих штаммах не обнаружено. Каковы антигенные различия этих вирусов?

4. На стр. 72 в 4-м выводе, указано, что коэффициент корреляции между результатами реакции нейтрализации и ИФА составляет « $r=-1.0$ », на странице 55 (таблица №8) коэффициент корреляции варьирует от 0,87 до 0,98.

5. В мировой научной литературе встречаются упоминания о разработке и использовании ИФА –тестов для выявления антител к вирусу гепатита уток типа 1 (X. Zhao, R.M. Phillips, G., L 1991; Бондаренко В, 1998; S. Mao, X. Ou, D. Zhu, 2016; X. Li, R. Zhao, W. Lin [et al.] 2017; M. Liu, T. Zhang, Y. Zhang [et al.] 2010), просьба указать принципиальные отличия от этих методов диагностики, тест-системы описанной в Вашей диссертации.

6. Как вы оцениваете диагностическую роль коэффициента вариации титров антител, есть ли какие-то пороговые значения данного параметра для оценки качества вакцинации или вероятности заболевания?

7. Каковы потенциальные возможности разработанной тест-системы для дифференциации поствакцинального иммунного ответа от сероконверсии после переболевания, отдельно для молодняка и взрослой птицы?

Указанные замечания и вопросы не отражаются на общей положительной оценке работы, они связаны с интересом к данной проблеме и носят дискуссионный характер.

## Заключение

Диссертационная работа Дмитриева Константина Юрьевича «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для промышленного птицеводства, диагностики особо опасной болезни. Работа выполнена на актуальную тему лично автором на высоком научном уровне и на достаточном для обобщения и выводов материале, полученном с использованием современных методов исследований. Считаю, что по актуальности, новизне исследований, научной и практической значимости диссертационная работа отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. от 01.10.2018), а ее автор Дмитриев Константин Юрьевич заслуживает ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

Канд. биол. наук,  
зав. сектором молекулярной биологии  
СФНЦА РАН

  
Афонюшкин В.Н.

Подпись В.Н.Афонюшкина заверяю:

Ученый секретарь СФНЦА РАН,  
канд. экон. наук

  
Зяблицева Я.Ю.

Дата: 02.02.2021

630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Краснообск  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский  
федеральный научный центр агроботехнологий Российской академии наук  
(СФНЦА РАН), тел. (383) 3484462, e-mail:referent@ievsvd.ru



Председателю диссертационного  
совета Д 220.038.07 на базе  
ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ  
А.Ю. Шантыз

### Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе Дмитриева Константина Юрьевича на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1- методом непрямого иммуноферментного анализа», представленную на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Фамилия, Имя, Отчество	Ирза Виктор Николаевич
Ученая степень (с указанием шифра специальности научных работников, по которому защищена диссертация)	Доктор ветеринарных наук (16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»)
Наименование диссертации	Средства и методы диагностики и специфической профилактики респираторного микоплазмоза, инфекционного синовита и инфекционного энцефаломиелита птиц
Ученое звание	-
Полное наименование организации в соответствии с уставом на момент представления отзыва	ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)
Наименование подразделения	Информационно-аналитический центр Россельхознадзора
Должность	Гл. науч. сотр.
Список основных	1. Волков М.С., Варкентин А.В., Ирза В.Н. и др. / Изучение

публикаций в  
рецензируемых  
научных изданиях за  
последние 5 лет (от  
5 до 15 публикаций)

- циркуляции вируса гриппа птиц на территории  
убсунурского миграционного очага Республики Тыва // Ветеринария сегодня, №4 (19), 2016 – С. 8-13.
2. Шестопалов А.М., Шаршов К.А., Варкентин А.В., Юшков Ю.Г., Леонов С.В., Галкина И.В., Арчимаева Т.П., Ирза В.Н., Щелканов М.Ю., Гаджиев А.А., Магомедова М.З. / Итоги многолетнего (2006 – 2016 гг.) мониторинга вируса гриппа А птиц на озере Убсу-Нур // Журнал «Юг России: Экология, развитие», Том 1, №3, 2016- С. 106-119.
  3. Протективные свойства отечественных серийных и экспериментальных вакцин в отношении вирусов высокопатогенного гриппа птиц подтипов H5N1 и H5N8, изолированных в 2015-2016гг. /В.Н. Ирза, М.С. Волков, А.В. Варкентин, С.В. Фролов, Д.А. Алтунин//Птица и птицепродукты.-№6,2017.
  4. Опыт ликвидации высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации в 2016-2017 гг. / М. С. Волков, В. Н. Ирза, А. В. Варкентин // Ветеринария сегодня. - 2018. - № 1. - С. 3-10.
  5. Борьба с высокопатогенным гриппом птиц на территории Российской Федерации в 2017 г. / В.Н. Ирза, М.С. Волков, А.В. Варкентин // Материалы XIX Международной конференции ВНАП «Мировые и российские тренды развития птицеводства: реалии и вызовы будущего – Сергиев-Посад, 2018. - С. 613-616.
  6. Анализ причин распространения высокопатогенного гриппа птиц А/Н5Nх на территории Российской Федерации в 2016 – 2019 гг. / М.С. Волков, В.Н. Ирза, А.В. Варкентин // Птица и птицепродукты – 2019, №3, - С. 16-19.
  7. О распространении вируса низкопатогенного гриппа А/Н9N2 в мире и на территории Российской Федерации. Проблемы искоренения болезни / М. С. Волков, А. В. Варкентин, В. Н. Ирза // Ветеринария сегодня. - 2019. - № 3 (30). - С. 51-56.
  8. Эпизоотологический мониторинг гриппа птиц на территории Республики Крым/ Гадзевич Д.В., Данильченко С.И., Ерофеев С.Г., и другие (+Ирза)// Ветеринария сегодня – Владимир. 2019. - № 1 (28) – С. 34-38.
  9. Результаты научной экспедиции в природные биотопы Республики Тыва в 2019г. для мониторинга инфекционных болезней в популяциях диких птиц / М.С. Волков, В.Н. Ирза, А.В. Варкентин, С.В. Роголев, А.В. Андриясов// Ветеринария сегодня. - 2020. - № 2



	<p>(33). - С. 83-89</p> <p>10. Мониторинг микоплазмозов птиц в Российской Федерации в 2019 году/А.Э. Меньщикова, Т.Н. Брундакова, М.С. Волков, В.Н. Ирза// Ветеринария сегодня. - 2020. - № 2 (33). - С. 90-93</p> <p>11. Ирза В.Н., Волков М.С., Варкентин А.В. Ситуация по особо опасным вирусным болезням в промышленном птицеводстве Российской Федерации // Птица и птицепродукты – 2020, №2, - С. 50-52</p> <p>12. Клинический случай низкопатогенного гриппа птиц H9N2 на птицефабрике яичного направления/ Варкентин А.В., Ирза В.Н., Волков М.С., Демченко Л.А.// Птица и птицепродукты – 2020, №3.- С. 10-13</p>
--	--

«14» декабря 2020 г.



*(Handwritten signature in blue ink)*

В.Н. Ирза

*Подпись В.Н. Ирзы заверяю:*

Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»,  
доктор ветеринарных наук, профессор  
Владимир Сергеевич Русалеев

*(Handwritten signature in blue ink)*





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

*от д.с.с. И.С.С.С.С.*  
*№ 04/2014*

## ОТЗЫВ

официального оппонента Ирзы Виктора Николаевича, доктора ветеринарных наук, главного научного сотрудника ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), на диссертационную работу **Дмитриева Константина Юрьевича** на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа», представленную к защите в диссертационный совет Д 220.038.07 на базе ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

### 1. Актуальность темы диссертации.

Вирусный гепатит утят (ВГУ) – остропротекающая контагиозная болезнь утят до 4-недельного возраста, характеризующаяся поражением печени и летальностью до 90-95%. Всемирной организацией здоровья животных (МЭБ) заболевание включено в перечень нотифицируемых болезней наряду с высокопатогенным гриппом птиц и ньюкаслской болезнью.

Степень поражения утят в стаде и потери от этой болезни зависят от вирулентности возбудителя, количества восприимчивых птиц, их возраста и наличия у них пассивного иммунитета, полученного трансвариально.

Риск заноса и распространения заболевания на территории России остается высоким. Единственным способом профилактики заболевания является применение вакцин.

С учетом широкого распространения ВГУ и массовой вакцинацией птиц необходимы своевременная диагностика ВГУ и определение иммунного статуса утят. Поэтому разработка современной отечественной тест-системы ИФА для этих целей является актуальной задачей.

## **2. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.**

Диссертантом проведена кропотливая работа по созданию тест-системы, подбору ее компонентов, режимов, сравнительным испытаниям. Результаты исследований показали работоспособность тест-системы и возможность ее широкого применения в ветеринарной практике.

Использованные автором материалы, современное оборудование и методы исследования обеспечили выполнение поставленных задач и обоснование научных положений, выводов и рекомендаций.

## **3. Достоверность и новизна научных положений.**

Достоверность научных положений, сформулированных в диссертационной работе, вытекает из результатов собственных исследований, проведенных с использованием современных методов и статистической обработкой экспериментальных данных. Впервые в РФ разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к вирусу ВГУ-1. Полученный патент РФ «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» № 2684417, 08.05.2018, RU составляет предмет новизны диссертации.

## **4. Ценность для науки и практики проведенной соискателем работы.**

Результаты исследований продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность иммуноферментной тест-системы при изучении динамики формирования антител у вакцинированных утят в экспериментальных и производственных условиях.

Разработаны Методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа 1» от 25. 01. 2016 г. и Методические положения



«Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа» от 28. 08. 2018 г.

Разработанные Методические положения рекомендованы для специалистов ветеринарных лабораторий и научно-исследовательских учреждений ветеринарного и биологического профиля.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что использование результатов исследований позволяет повысить эффективность диагностических и профилактических мероприятий при контроле ВГУ. Данные полезны для ветеринарных врачей как государственной ветеринарной службы, так и птицеводческих хозяйств.

### **5. Завершенность диссертации.**

Диссертация изложена на 106 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; собственные исследования, включающие материалы и методы, результаты исследований; обсуждение результатов; выводы; практические предложения; список литературы, список сокращений и приложение. Список литературы включает 151 источник, из них 82 иностранных. Работа иллюстрирована 14 таблицами, 6 рисунками и 3 формулами, оформлена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ.

Во введении автором обоснована цель исследований и определены задачи, требующие своего решения для достижения поставленной цели. Представлены сведения об апробации диссертации: результаты исследований по теме диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Методического совета отдела вирусологии и ОБП и Ученого совета ВНИВИП (2016-2018), Международной научно-практической конференции «Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования» (Москва, 2017); Международной научно-практической конференции: «Проблемы и приоритеты развития науки в XXI веке» (Смоленск, 2018); Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в



сельском хозяйстве» (г. Екатеринбург, 2018); научно-практической конференции «Современные подходы и перспективы решения актуальных зооветеринарных проблем в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

В обзоре литературы изложены данные, характеризующие современное состояние рассматриваемой проблемы и возможные пути ее решения.

В разделе «Материалы и методы» указаны способы исследований и перечень материалов и оборудования, подтверждающие высокий методический уровень работы.

Собственные исследования выполнены в 2016-2018 гг. в отделе вирусологии и опухолевых болезнях птиц Всероссийского научно – исследовательского ветеринарного института птицеводства (ВНИВИП) в соответствии с научно-технической программой НИР № 0599-2014-0221. Соисполнителями в работе по получению антивидовых иммунопероксидазных конъюгатов, специфичных к IgG уток, были сотрудники ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск.

Логично и последовательно изложены этапы исследований по разработке тест-системы. Отработан метод концентрирования и очистки вируса гепатита утят типа 1 из аллантаической вирусосодержащей жидкости, разработана схема получения высокоактивной специфической и антивидовой сыворотки для ИФА. Получен активный, специфичный и стабильный при хранении в жидком состоянии антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG уток. Оптимизированы параметры проведения ИФА с использованием разработанной тест-системы. Сравнительными исследованиями по определению специфических антител в сыворотке крови в ИФА и РН установлена высокая корреляция их значений.

Обсуждение результатов собственных исследований в сопоставлении с данными литературы дополняет представленные материалы, подчеркивая их актуальность и новизну. В диссертации приведено 6 выводов, которые логично вытекают из полученных автором данных. Выводы соответствуют

поставленным задачам и показывают, что цель работы достигнута, и задачи исследований успешно решены.

#### **6. Подтверждение опубликования результатов в научной печати**

По теме диссертации автором опубликованы 9 научных работ, в т.ч. 2 статьи – в рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ.

#### **7. Соответствие содержания автореферата материалам диссертации**

Автореферат диссертационной работы Дмитриева К.Ю. «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа» адекватно отражает содержание диссертации.

#### **8. Вопросы и замечания**

1. Автор указывает (стр. 5 автореферата и стр. 6 диссертации), что были разработаны Методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа 1» от 25. 01. 2016 г. и Методические положения «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа» от 28. 08. 2018 г., а также получен патент РФ «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» № 2684417, 08.05.2018, RU. Почему в приложении к диссертации представлены только Методические положения от 28. 08. 2018 г., а копии методических положений от 25. 01. 2016 г. и патента не приложены? Это могло бы ярче подчеркнуть достоинства работы.
2. Было бы целесообразней представить результаты реакции нейтрализации (табл. 3, стр. 42) в развернутом виде, а не только в констатирующем формате.
3. В подразделе 2.2.1.4 диссертации (стр. 41-42) указано: «Для получения специфической сыворотки использовали разные схемы иммунизации, при которых титры полученных сывороток зависели от чистоты антигена вируса и кратности его введения. Трехкратная иммунизация



утят нарастающими дозами очищенного вируса гепатита позволила получить высокоактивную специфическую сыворотку». Желательно уточнить дозы, кратность и использование адьювантов. В этом же подразделе в таблице 3 представлены данные об уровне антител в гипериммунной сыворотке в РН, но не указано число повторностей.

4. В подразделе 2.2.1.6 (получение антивидовой сыворотки, стр. 43) указано, что «титр антивидовых антител определяли в реакции нейтрализации. Вируснейтрализующая активность сыворотки составляла от 3,0- 4,0 Ig». Желательно пояснить подробнее, как определен уровень антивидовых антител.

5. В подразделе 2.2.1.7 (получение и контроль иммунопероксидазного конъюгата, стр. 45) указано, что «Конъюгат хорошо сохранялся в нативном виде от 1 до 3 лет при температуре 2 - 8°C в бытовом холодильнике. Активность конъюгата оценивали в прямом методе иммуноферментного анализа, которая составила 1:12800». Были ли промежуточные исследования активности конъюгата в течение 3 лет хранения?

6. На стр. 51 - Определение диагностического титра в ИФА- и стр. 57, табл. 8, указано, что использовали в качестве гетерологичных сыворотки крови к возбудителю реовирусного теносиновита кур, вирусам инфекционного бронхита и ньюкаслской болезни, парвовирусу гусей. Поскольку тест-система предназначена для тестирования сывороток крови уток (анти-утиный конъюгат), использование в данных экспериментах в качестве гетерологичных сывороток других видов птиц является некорректным (т.е., результаты будут заведомо отрицательными), и подвергается сомнению вывод о специфичности разработанной тест-системы.

7. В таблицах 5(стр.52) и 8 (стр. 57), указано, что определение титра антител и активности сывороток крови в реакции нейтрализации и с



помощью иммуноферментной тест-системы проведено в 5 и 3 повторностях, соответственно, однако не указан разброс значений ( $M \pm m$ ).

Некоторые замечания носят принципиальный характер, но в целом работа представляет большой научный и практический интерес и заслуживает положительной оценки, поскольку востребованность разработанной и предложенной соискателем тест-системы для ветеринарной практики чрезвычайно велика.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Дмитриева Константина Юрьевича на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая по актуальности, новизне, научной и практической значимости отвечает требованиям ВАК РФ, 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.

8 февраля 2021г.  
Официальный оппонент,  
главный научный сотрудник  
ФГБУ «Федеральный центр  
охраны здоровья животных»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)  
доктор ветеринарных наук



Ирза В.Н.

**Подпись В.И. Ирзы заверяю:**  
Ученый секретарь  
ФГБУ «ВНИИЗЖ»  
доктор ветеринарных наук, профессор



Русалеев В.С.