

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

Сведения о ведущей организации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» по диссертационной работе Дмитриева Константина Юрьевича на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят 1 типа методом непрямого иммуноферментного анализа», представленную на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология с микологией и микотоксикологией и иммунология.

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина
Ведомственная принадлежность	Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Руководитель (зам. руководителя) организации, утверждающий отзыв ведущей организации	Сергей Владимирович Позябин, доктор ветеринарных наук, профессор
Почтовый индекс и адрес организации	109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23
Официальный сайт организации	http://mgavm.ru/
Адрес электронной почты	rector@mgavm.ru
Телефон	+7 (495) 377-91-17
Сведения о структурном подразделении	Кафедра зоогигиены и птицеводства имени А.К. Даниловой, телефон: +7 (495)377-93-03 e-mail: kaf_zoogigieny_fzta@mgavm.ru Заведующий кафедрой Кочиш Иван

Иванович, академик РАН, доктор сельскохозяйственных наук, профессор
Смоленский Владимир Иванович, доктор биологических наук, профессор;
Направления научной работы структурного подразделения: диагностика болезней птиц, разработка и совершенствование применения антисептических средств, естественных метаболитов и экологически безопасных препаратов для профилактики заболеваний, повышения естественной резистентности и продуктивности сельскохозяйственных животных и птиц.

Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (от 5 до 15 публикаций)

1. Монстакова Т.В., Азарнова Т.О., Кочиш И.И. Роль оптимизации метаболических процессов в системе снижения отходов инкубации // - Птицеводство. - 2020. - № 7-8. - С. 44-50.
2. Кочиш И.И., Мясникова О.В., Мартынов В.В., Смоленский В.И. Микрофлора кишечника кур и экспрессия связанных с иммунитетом генов под влиянием пробиотической и пребиотической добавок // - Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 2. С. 315-327.
3. Кочиш И.И., Смоленский В.И., Нуралиев Е.Р., Кочиш О.И. Комплексная программа обеспечения биологической безопасности промышленных птицеводческих хозяйств яичного направления // - Ветеринария. 2020. № 2. С. 8-13.
4. Смоленский В.И. Владимир Смоленский: «Прививки от птичьего гриппа - вчерашний день. Мы работаем над технологиями будущего» // - Аграрная наука. - 2018. - № 3. - С. 24-26.
5. Смоленский В.И., Киселев А.Л., Титова Т.Г. Научный подход к профилактике кокцидиоза птиц // - Птицеводство. - 2018. - № 1. - С. 50-52.
6. Смоленский В.И., Киселев А.Л. Оценка эффективности сочетанного применения живых и инактивированных вакцин против ньюкаслской болезни при выращивании цыплят-бройлеров. // - Ветеринария. - 2017. - № 1. - С. 13-15.
7. Смоленский В.И., Киселев А.Л., Евсюков М.В. Вакцины против инфекционного бронхита кур и болезни Гамборо. // - Птицеводство. - 2017. - № 4. - С. 39-40.

8. Смоленский В.И. Актуальные проблемы профилактики ньюкаслской болезни // - Птица и птицепродукты. – 2017. – № 6. – С. 19-21.
9. Смоленский В.И., Киселев А.Л., Евсюков М.В. Эффективность вакцин производства Биовак (Израиль) против инфекционного бронхита кур и болезни Гамборо // - Ветеринария. – 2017. – № 9. – С. 21-22.
10. Смоленский В.И., Киселев А.Л. Новые вакцины против ньюкаслской болезни //- Птицеводство. – 2016. – № 12. – С. 53-54.
11. Некрутов А.В., Смоленский В.И. Профилактика инфекционной бурсальной болезни //- Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. – № 2 (18). – С. 71-78.

Проректор по науке и инновациям
Печать

Л.А. Гнездилова

« 28 » 12 2020 г.



«Утверждаю»

Ректор ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина», доктор ветеринарных наук, профессор _____ С.В. Позябин
«05» _____ 2021 года

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина) 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 исследования. В условиях развития промышленного птицеводства, в том числе утководства, происходит сосредоточение большого поголовья птицы на ограниченной территории. В утководческих хозяйствах размещение разновозрастных групп птицы на одной площадке и приток новых партий суточного молодняка создает риск возникновения эпизоотий вирусного гепатита утят типа 1. Генетическая вариабельность возбудителя болезни, его способность к длительной персистенции в организме переболевшей птицы не позволяют разорвать

эпизоотическую цепь в цикле развития патогена, в результате чего болезнь приобретает стационарный характер.

Вирусный гепатит утят типа 1 (ВГУ-1) – высоко контагиозная болезнь, характеризующаяся высокой смертностью утят до 4-6-недельного возраста, острым течением с преимущественным поражением печени. ВГУ-1 широко распространен в России и в мире. Нередко вирусный гепатит утят типа 1 протекает в ассоциации с инфекциями вирусной и бактериальной этиологии, что затрудняет диагностику болезни. Поэтому для разработки и успешного проведения противоэпизоотических и профилактических мероприятий необходимы лабораторные исследования, в том числе с использованием методов серологической диагностики.

Для определения уровня антител в пробах сыворотки крови уток широко используют высокоспецифичную реакцию нейтрализации. Однако постановка реакции нейтрализации является длительной и методически трудоемкой, особенно при исследовании большого количества проб.

В настоящее время многие исследователи для контроля уровня поствакцинального или постинфекционного иммунного ответа успешно используют метод иммуноферментного анализа (ИФА). Иммуноферментный анализ – высоко специфичный и высоко чувствительный метод. Кроме этого, быстрота проведения анализа, возможность исследования большого количества проб, автоматизация процесса постановки реакции с компьютерной обработкой результатов, делает иммуноферментный анализ перспективным методом исследований.

В связи с вышеизложенным, разработка высокочувствительного и специфичного метода для проведения ретроспективной диагностики вирусного гепатита утят типа 1 и оценки поствакцинального иммунного ответа является актуальной и отвечает требованиям развития современной ветеринарной науки.

Научная новизна и достоверность полученных результатов.
Соискателем впервые в Российской Федерации разработана

иммуноферментная тест-система для выявления антител к антигену вируса гепатита утят типа 1. Был 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.

Научная новизна исследований подтверждена Решением о выдаче патента на изобретение «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» от 19.02.2019 г. (заявка № 2018117226/15(026852).

Достоверность полученных результатов подтверждена тем, что исследования проведены на большом фактическом материале с использованием современных методов исследований. Результаты исследований статистически обработаны с помощью критерия Стьюдента, для вычислений применяли компьютерную программу «Microsoft Excel». Иммуноферментная тест-система испытана как в лабораторных, так и в производственных условиях.

Практическая и теоретическая значимость работы. В результате проведенных исследований разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к антигену вируса гепатита утят типа 1, которая показала высокую чувствительность и специфичность при изучении динамики поствакцинального формирования антител в экспериментальных условиях и в производственных условиях. Данная тест-система позволит достоверно и в короткие сроки проводить диагностические и мониторинговые исследования

проб сыворотки крови для утководческих хозяйств. 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.

Апробация результатов исследований. 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).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из которых 2 работы опубликованы в изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденный ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность, замечания по оформлению диссертации. По структуре, объему и содержанию, диссертационная работа К.Ю. Дмитриева соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ. Диссертация 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. Список литературы включает 151 источник, из которых 82 - зарубежные.

В разделе «Введение», соответствующем разделу 1 «Общая характеристика работы» в автореферате, автором в краткой форме обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследований, показаны новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, количество публикаций, структура и объем диссертации.

Глава 1 «Обзор литературы» содержит сведения об эпизоотологических аспектах вирусного гепатита утят типа 1, его распространении и причиняемом экономическом ущербе. В разделе представлены данные о биологических свойствах возбудителя, описаны клинические и патоморфологические признаки, изложены сведения об основах иммунопрофилактики и методах диагностики болезни. В отдельной главе, посвященной иммуноферментному анализу, показаны преимущества и недостатки вариантов метода, в сравнении с другими серологическими методами, описаны его актуальность и перспективы. Обзор литературы в целом отражает современное состояние проблемы.

Глава 2 «Собственные исследования» включает разделы «Материалы и методы исследований» и «Результаты собственных исследований».

В разделе 2.1. «Материалы и методы исследований» указан период и место выполнения работы, отражена структура исследований, перечислены объекты исследований, используемые среды, растворы, реактивы и др. материалы, оборудование и приборы. В разделе дано краткое описание методов и методик исследований, которые соответствуют уровню и сложности поставленных задач и обеспечивают получение в ходе исследований достоверных результатов.

В разделе 2.2. «Результаты собственных исследований» изложены ход проведения и результаты исследований по разработке и апробированию тест-системы для серологической диагностики. Вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа. Результаты исследований представлены в соответствии с целью работы и поставленными задачами. В разделе выделены 3 основных подраздела.

В подразделе 2.2.1. «Получение иммуноспецифических компонентов для иммуноферментного анализа» описаны результаты исследований, связанные с получением вирусосодержащего материала, инаktivацией вируса, получением очищенного антигена вируса гепатита утят типа 1, специфической сыворотки крови к вирусу гепатита утят типа 1, антивидовой сыворотки, иммунопероксидазного конъюгата, а также данные по выделению иммуноглобулинов и контролю иммунопероксидазного конъюгата.

В подразделе 2.2.2. представлены результаты разработки иммуноферментной тест-системы, такие как определение оптимальных концентраций и условий взаимодействия компонентов тест-системы (определение концентрации антигена, рабочего разведения антивидового конъюгата, времени и температуры иммобилизации антигена, температуры и времени инкубации сыворотки с иммобилизованным антигеном, диагностического титра), расчет титра антител по одному разведению, оценка чувствительности, специфичности и стабильности иммуноферментной тест-системы, оценка воспроизводимости результатов ИФА.

Подраздел 2.2.3. посвящен результатам исследований, которые были получены при апробации иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу гепатита утят типа 1. В подразделе отражены данные по динамике формирования антител у вакцинированных птиц в лабораторных и производственных условиях, по продолжительности материнского иммунитета против вирусного гепатита утят в производственных условиях.

В главе 3 «Обсуждение результатов исследований» проведен сравнительный анализ результатов исследований, отраженных в литературных

источниках и результатов экспериментальных исследований, полученных соискателем в ходе проведения работы.

В главе 4 представлено 6 выводов и практические предложения. Выводы логически вытекают из поставленных задач и основных результатов проведенных исследований. На основе выводов сформулированы практические предложения по использованию тест системы для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа.

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 рецензировании диссертации Дмитриева Константина Юрьевича возникли ряд замечаний и вопросов, на которые хотелось бы получить ответы и разъяснения:

1. В тексте диссертационной работы присутствуют технические ошибки и неточности. Например, на странице 57 диссертации в таблице 8 коэффициент корреляции, имеющий положительные значения, прописан как «-r»; на странице 66 фраза «Высокая специфичность и чувствительность ИФА в сочетании с быстротой анализа...» написана дважды; на странице 34 в разделе «Материалы и методы» предложение «Вирусосодержащую инактивированную аллантоисную жидкость осаждали методом дифференциального центрифугирования...», вероятно, имелось в виду осаждение вируса.

2. На странице 40 написано, что «Вирусосодержащую инактивированную аллантоисную жидкость центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут и концентрировали ВСМ методом дифференциального центрифугирования при 60000g...». Во-первых, вероятно, имели в виду метод ультрацентрифугирования. Во-вторых, может быть, следовало выражать количество оборотов при

центрифугировании и при ультрацентрифугировании в одних единицах измерения, т.е. или в об/мин или в g.

3. Правильно ли мы понимаем, что в описании процесса получения антивидового иммуноглобулина G на кроликах, вместо ионообменной смолы диэтиламиноэтила (ДЭАЭ) в методе ионообменной хроматографии, по ошибке, указан гель, используемый в методе гельфильтрации (сафадекс G-200)?

4. На странице 36 в разделе «Материалы и методы» описано получение иммуноглобулинов G (IgG) и выделение иммуноглобулинов Y (IgY). В чем отличие этих иммуноглобулинов? С какой целью были получены IgY?

5. Планируете ли Вы продолжать исследования по применению тест-системы с целью определения пороговых значений титров антител, обеспечивающих защиту птицы от полевого вируса, а также с целью определения допустимых значений уровня поствакцинальных антител при различных схемах иммунизации?

Отмеченные замечания не затрагивают основных положений диссертационной работы, не снижают ее научной и практической ценности, а вопросы носят дискуссионный характер.

Заключение

Представленная диссертация представляет собой самостоятельную, законченную научно-квалификационную работу, в которой предложена новая иммуноферментная тест-система для серологической диагностики особо опасной болезни уток и для оценки поствакцинального иммунного ответа.

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), предъявляемым к кандидатским диссертациям, паспорту специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, а ее автор

Дмитриев Константин Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Отзыв на диссертационную работу Дмитриева Константина Юрьевича рассмотрен и одобрен на заседании кафедры зоогигиены и птицеводства имени А.К. Даниловой (протокол №11 от 5 февраля 2021 года).

Отзыв ведущей организации составил:

профессор кафедры зоогигиены и птицеводства

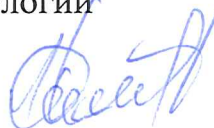
имени А.К. Даниловой ФГБОУ ВО

«Московская государственная академия

ветеринарной медицины и биотехнологии

– МВА имени К.И. Скрябина»,

доктор сельскохозяйственных наук



Манукян Вардгес Агавардович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23.

Телефон: +7 (495) 377-93-03

E-mail: kaf_zoogigieny_fzta@mgavm.ru