

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Сухинина Александра Александровича на диссертацию Спрыгина Александра Владимировича «Заразный узелковый дерматит КРС: генодиагностика и изучение потенциальных переносчиков на территории Российской Федерации», представленной к защите в диссертационный совет 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10 «Вирусология»

Актуальность темы

Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота (ЗУД КРС) относится к особо опасным трансграничным заболеваниям, эндемичным ареалом которого является страны Африки. Возбудителем является вирус р.*Capripoxvirus*, сем. *Poxviridae*. На территории РФ данное заболевание впервые выявлено в 2015 г. в Республике Дагестан Северо-Кавказского Федерального округа. В настоящее время эпизоотическая обстановка остается напряженной, поскольку вспышки заболевания ежегодно регистрируются вдоль границы Российской Федерации с Р. Казахстан, Р. Монголия и КНР.

Учитывая трансграничную природу заболевания, а также слабую изученность возбудителя с точки зрения молекулярной биологии и вопросов трансмиссии, ключевым элементом стратегии сдерживания является своевременная диагностика ЗУД КРС. Диагноз на ЗУД КРС ставится на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических и лабораторных данных. Учитывая современный уровень развития молекулярной биологии, полимеразная цепная реакция (ПЦР) является приоритетным методом для детекции вирусного генома вируса ЗУД КРС с целью оперативного применения противоэпизоотических мероприятий. Использование ПЦР рекомендовано Международным Противоэпизоотическим Бюро (МЭБ) для постановки диагноза на ЗУД КРС. На момент первых вспышек в 2015 г. на территории нашей страны не существовало доступных отечественных тест-систем ПЦР для проведения диагностических исследований на ЗУД КРС, что подчеркивает острую необходимость разработки экспресс-методов на ЗУД КРС и внедрения их в лабораторную практику.

Принимая во внимание недостаточный уровень знаний о вирусе ЗУД КРС, включая небольшое количество полногеномных последовательностей в международных базах данных не только вируса ЗУД КРС, но и родственных каприпоксвирусов, разработка ПЦР затруднена, негативно влияя на такие валидационные параметры тест-систем ПЦР, как специфичность. В связи с эпизоотической ситуацией по ЗУД КРС в нашей генетический анализ циркулирующих в дикой природе изолятов вируса ЗУД КРС и пополнение международных генетических баз данных является весомыми вкладом в развитие науки.

Другим важным аспектом борьбы с ЗУД КРС является понимание того, как вирус передается от животного к животному. Имеющиеся в литературе сведения о трансмиссии вируса ЗУД КРС фрагментарны и не дают точного ответа о том,

какие конкретно переносчики являются вектором вируса. Это особенно актуально для северного полушария, где исторически вирус ЗУД КРС ранее не регистрировался, но массово распространился за несколько лет от Северного Кавказа до Дальнего Востока.

Учитывая вышеизложенное, диссертационная работа Спрыгина Александра Владимировича по разработке средств молекулярной диагностики ЗУД КРС, изучению генетического разнообразия изолятов вируса ЗУД КРС и апробации разработанных тест-систем на потенциальных переносчиках со вспышек, является своевременной и научно-обоснованной.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей диссертационной работы было: разработать и реализовать комплекс методов идентификации и дифференциации возбудителя ЗУД КРС на основе анализа генома; выявить филогенетические связи изолятов вируса ЗУД КРС, циркулирующего в РФ с 2015 года; изучить потенциальных переносчиков вируса в различных географических и климатических зонах РФ.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. создание скрининговой тест-системы ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов;
2. разработка тест-системы ПЦР-РВ для выявления генома вируса ЗУД КРС;
3. разработка тест-системы ПЦР-РВ для выявления генома полевых изолятов вируса ЗУД КРС;
4. разработка тест-системы ПЦР-РВ для выявления генома вакцинных штаммов типа вируса ЗУД КРС типа Neethling;
5. осуществление филогенетического анализа выявленных изолятов вируса ЗУД КРС, циркулирующего в РФ в период с 2015 по 2018 гг;
6. проведение энтомологических исследований и апробация разработанных тест-систем на насекомых, собранных во время вспышек ЗУД КРС.

Научная новизна работы

Научная новизна исследований заключается в том, что автором впервые в России разработан комплекс тест-систем на основе ПЦР-РВ для выявления генома каприпоксвирусов и вируса ЗУД КРС с последующей дифференциацией полевых изолятов и вакцинных штаммов, включая идентификацию рекомбинантных изолятов. Ряд тест-систем не имеет аналогов на территории РФ.

Установлены полные нуклеотидные последовательности двух изолятов вируса ЗУД КРС, циркулирующего на территории РФ.

Автор впервые установил факт гомологической рекомбинации у вируса ЗУД КРС, что ранее являлось только гипотезой.

Изучена активность мокрецов р. *Culicoides* в трех климатически различных регионах РФ с помощью световой ловушки.

Впервые выявлено, что некровососущие мухи могут быть контаминированы ДНК вируса ЗУД КРС, причем вирусная ДНК присутствует

внутри и снаружи насекомого. Впервые вирусная ДНК также выявлена в слепнях.

Научная новизна полученных результатов подтверждена 4 патентами РФ на изобретения и 20 печатными работами в ведущих международных рецензируемых журналах.

Оценка содержания диссертации и её оформления.

Структура и объем диссертации полностью соответствуют требованиям ВАК РФ. Диссертация содержит 347 страниц компьютерного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, список сокращений и условных обозначений, список использованных источников и приложения. В работе представлено 41 таблица и 70 рисунков. Список использованной литературы включает 295 источников. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, её научную новизну и практическую значимость.

В характеристике работы доказана актуальность решаемой проблемы, сформулированы цель и задачи, научная новизна, практическая значимость и основные положения диссертации, выносимые на защиту.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность темы диссертации, обозначаются цель и задачи, научная новизна, определяется теоретическая и практическая значимость работы.

Обзор литературы состоит из разделов, содержащих информацию о эпизоотологической характеристике вируса ЗУД КРС, его биологических и филогенетических свойствах. Освещаются вопросы диагностики и нуклеотидного секвенирования с последующим биоинформатическим анализом. Отдельное внимание уделено переносчикам ЗУД КРС и вопросам трансмиссии вируса.

В разделе «Материалы и методы» приводится характеристика биоматериала для тестирования, реактивов, оборудования и методов анализа. Методология проведенных исследований включает: биоинформатические, молекулярно-биологические (ПЦР-РВ, секвенирование), энтомологические методы. Автор диссертации проведены исследования с применением материалов, методов и оборудования соответствующих современному уровню лабораторной диагностики.

В разделе «Результаты собственных исследований» автором приведены полученные результаты по разработке: метода по выявлению генома каприплексвирусов с помощью ПЦР в режиме реального времени; метода по выявлению генома каприплексвирусов методом ПЦР-РВ в молоке; метода по выявлению генома вируса заразного узелкового дерматита КРС с помощью ПЦР в режиме реального времени; метода по выявлению генома полевых изолятов вируса ЗУД КРС с помощью ПЦР в режиме реального времени; метода по выявлению генома вакцинного штамма вируса заразного узелкового дерматита КРС типа Neethling с помощью ПЦР в режиме реального времени; метода по выявлению генома вакцинного штамма вируса заразного узелкового дерматита

КРС типа Neethling с помощью ПЦР в режиме реального времени; метода по дифференциации ДНК вируса заразного узелкового дерматита КРС на полевые и вакциноподобные изоляты с помощью ПЦР в режиме реального времени с анализом пиков плавления высокого разрешения. Приведен полногеномный анализ изолятов Dagestan/2015 и Saratov/2017. Описаны и апробированы подходы по отлову насекомых – потенциальных переносчиков вируса ЗУД КРС.

В разделе «Заключение» Спрыгин А.В. лаконично и емко обобщает результаты работы, формулирует выводы и практические предложения.

Важно отметить, что выводы и практические предложения полностью отражают результаты проведенных исследований, они обоснованы, их достоверность не вызывает сомнения.

Степень достоверности и апробации результатов

Диссертационная работа Спрыгина А.В. выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием большого объема экспериментального материала. Степень достоверности результатов проведенных экспериментов подтверждена комиссионными испытаниями, обработкой статистическими методами.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных заседаниях по проблеме ЗУД КРС: ежегодных заседаниях постоянной группы экспертов по ЗУД КРС под эгидой МЭБ GF-TADs (г. Охрид, Македония, 2018 г.; г. Афины, Греция, 2019 г.); в рамках ежегодных совещаний научного консорциума DEFEND по борьбе с ЗУД КРС в странах Европы (г. Мехелен, Бельгия, 2019 г.). Результаты научных исследований доложены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» и опубликованы в материалах международных рецензируемых журналов и научных конференций (Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе, Кострома, 2019; 12th Annual Meeting EPIZONE, Vienna, 2018; «13th Annual Meeting EPIZONE, Berlin, 2019).

Результаты диссертационных исследований опубликованы в 20 научных работах, из них 5 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 11 – в международных рецензируемых журналах Scopus и Web of Science, 4 – в материалах международных конференций.

В диссертации Спрыгина А.В. все высказывания научного характера подкреплены соответствующими источниками российской и международной научной литературы.

Автором разработаны тест-системы ПЦР для диагностики ЗУД КРС, не имеющие аналогов на территории нашей страны. Получены современные данные о филогенетическом разнообразии изолятов вируса ЗУД КРС в РФ в период с 2015 по 2018 гг. Получены два полных генома и определены нуклеотидные последовательности 21 изолята, выделенных из различных регионов РФ. Проведен их генетический анализ, изучены филогенетические отношения с другими изолятами, последовательности которых представлены в базе данных GenBank. Полученные результаты позволяют проводить более

детальный анализ молекулярной эволюции вируса ЗУД КРС в мире. Установленный факт гомологической рекомбинации у вируса ЗУД КРС открывает возможности фундаментального изучения биологических свойства каприпоксвирусов. Проведенная энтотомологическая работа лежит в основе риск-ориентированного подхода по исследованию трансмиссивных инфекций.

Представленная работа, безусловно, полезна в научном и практическом плане и направлена на решение актуальных проблем отрасли.

Всё выше изложенное позволяет дать работе положительную оценку. Вместе с тем по работе имеются некоторые вопросы и замечания:

1. *Какие инфекционные болезни регистрировались у КРС в хозяйствах Дагестана в момент вспышки заразного узелкового дерматита КРС?*
2. *Каковы отличия вакциноподобных изолятов и рекомбинантных вакциноподобных изолятов от вакцинных штаммов?*
3. *Какую роль вакциноподобные изоляты и рекомбинантные вакциноподобные изоляты играют в противоэпизоотическом мониторинге ЗУД КРС?*
4. Вы пишете что такой серологический метод, как вируснейтрализация является золотым стандартом в диагностической практике, однако, для каприпоксвирусов он имеет ограниченное применение, поскольку болезнь не всегда сопровождается выработкой гуморального иммунитета.
Вопрос: По Вашему мнению какие методы должны лечь в основу определения клеточного иммунитета при ЗУД КРС?
5. В тексте диссертационной работы пишете что в качестве мишени выбран ген, кодирующий поверхностный белок Р32 – консервативный среди всех каприпоксвирусов. Белок гена Р32 является одним из структурных белков капсида всех вирусов сем. *Capripoxvirus*, который играет роль главной антигенной детерминанты.
Вопрос: Какие антитела вырабатываются на данный антиген?
6. Какова сравнительная стоимость предложенных Вами диагностических наборов с зарубежными аналогами?
7. Как влияют рекомбинации на биологические свойства мутанта?
8. Как изменилась эпизоотология ЗУД КРС, когда начали распространяться рекомбинантные штаммы?

Отмеченные недостатки не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку диссертации, несомненно, содержащей научную новизну и представляющей собой целостное исследование.

Заключение.

Диссертационная работа Спрыгина А.В. выполнена на современном научно-методическом уровне и представляет собой завершенную, научно-квалификационную работу, в которой содержится решение научной задачи, имеющей существенное практическое значение для ветеринарной вирусологии, как получения новых данных о диагностике, филогении и трансмиссии вируса

ЗУД КРС в северных широтах.

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, обоснованные выводы, свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку и характеризуется существенной практической значимостью.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов, объему выполненных исследований и оформлению диссертационная работа «Заразный узелковый дерматит КРС: генодиагностика и изучение потенциальных переносчиков на территории Российской Федерации», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10 «Вирусология» отвечает требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г за № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Спрыгин А.В., заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»,
доктор биологических наук,
профессор
30.11.2021 года

Сухинин Александр Александрович

Подпись профессора Сухинина А.А. заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО СПбГУВМ,
доктор ветеринарных наук



Гаврилова Надежда Алексеевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Адрес организации: 196084, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Черниговская ул., д. 5.

Телефон: +7 (812) 388 36 31, адрес электронной почты: secretary@spbguvm.ru