

Отзыв

официального оппонента кандидата биологических наук Лага Виты Юрьевны на диссертационную работу Гусевой Нелли Андреевны на тему «Молекулярно-генетические свойства изолятов вируса болезни Ньюкасла, выявленных на территории Российской Федерации в 2019-2023 гг.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 Вирусология

Актуальность темы. Ньюкаслскую болезнь (НБ) вызывают вирулентные штаммы *Orthoavulavirus javaense*, также известного как вирус ньюкаслской болезни (ВНБ). ВНБ способен поражать более 200 видов птиц, но тяжесть заболевания зависит как от хозяина, так и от штамма вируса.

Предпочтительными методами диагностики НБ является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и секвенирование. С помощью данных методов также определяют вирулентность любого выявленного изолята ВНБ. Для определения вирулентности, также, может быть использован метод определения индекса внутримозговой патогенности при заражении однодневных цыплят (ICPI). Штамм или изолят ВНБ считается вирулентным при значении ICPI 0,7 или выше или при наличии нескольких (трех и более) основных аминокислот в позициях 112-116 и фенилаланина в позиции 117 сайта протеолитического расщепления белка слияния F0.

Вирусы ньюкаслской болезни обладают высоким генетическим разнообразием, поэтому молекулярно-генетические методы очень часто применяются для рутинной диагностики НБ, так как предлагают специфичное и своевременное выявление патогена.

Согласно последней системе классификации штаммов и изолятов ВНБ, предложенной Димитровым и соавторами в 2019 году, выделяют два класса – I и II. Вирусы класса I принадлежат к одному генотипу, а вирусы класса II — к более чем 20 генотипам.

В последние десятилетия наибольшее значение для стран Европы, Азии и Африки имеют вирусы генотипа VII. Согласно данным об аминокислотной последовательности сайта протеолитического расщепления белка слияния, все вирусы данного генотипа являются вирулентными. Вирусами VII генотипа была вызвана четвертая панзоотия НБ, которая продолжается и в наше время. На территории России вирусы данного генотипа регистрируют с конца 20 века: субгенотип VII.1.1 (2000-2010 гг, 2019 г) и VII.2 (2013 г, 2016-2017 гг). В связи с этим, изучение молекулярно-генетических свойств изолятов и штаммов ВНБ, циркулирующих на территории РФ является актуальной задачей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Соискателем в диссертационной работе представлены результаты исследования проб биологического материала от птиц, с целью выявления РНК вируса ньюкаслской болезни, филогенетический анализ и молекулярно-генетические свойства, а также эволюционный анализ вариабельности

нуклеотидных последовательностей изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1. Разработаны и оформлены «Методические рекомендации по выявлению РНК изолятов *Avian orthoavulavirus 1* генотипа VII и его производных с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени» и «Методические рекомендации по определению первичной структуры генов F и HN изолятов вируса ньюкаслской болезни генотипа VI с помощью ОТ-ПЦР и нуклеотидного секвенирования». Проведено депонирование девяти изолятов ВНБ субгенотипа VII.1.1 и одного изолята субгенотипа VI-g в Государственную коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Получен патент на «Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц.

Таким образом, выдвинутые соискателем научные положения, выводы и рекомендации полностью отвечают поставленным цели и задачам, соответствуют содержанию диссертации, аргументированы и обоснованы результатами собственных исследований.

Новизна и достоверность исследований. В ходе исследований автором были определены основные генетические группы изолятов ВНБ, циркулирующих на территории РФ: вирулентные вирусы генотипа VII, вирулентные изоляты генотипа VI и его производных, авирулентные вирусы генотипа I класса II, лентогенные и реже мезогенные вакцинные штаммы генотипов I, II и III. Среди выявленных групп наибольший интерес представляют вирусы субгенотипа VII.1.1 (или по более ранней классификации субгенотипа VII-L). По результатам филогенетического и эволюционного анализов было показано, что российская ветвь изолятов субгенотипа VII-L выделяется в отдельную монофилетическую группу.

В диссертационной работе соискатель применял комплекс современных молекулярно-генетических и статистических методов (ОТ-ПЦР, нуклеотидное секвенирование по Сэнгеру, полногеномное секвенирование, филогенетический и эволюционный анализы), которые обеспечили достоверность проведенных исследований.

По материалам диссертационной работы опубликовано восемь научных работ: из них три - статьи в рецензируемых изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; патент РФ на изобретение; публикации в Трудах и материалах конференций. Полученные результаты доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2020-2023 гг.).

Научная и практическая значимость. Изучение молекулярно-генетических свойств и выделение циркулирующих изолятов ВНБ имеет важное научное и практическое значение. Полученные данные показывают ситуацию по ньюкаслской болезни на территории РФ.

Выделенные и депонированные штаммы могут быть использованы для

разработки и проверки эффективности средств диагностики и профилактики. Разработанные в ходе исследований методические рекомендации могут быть использованы в лабораторной практике при диагностике НБ.

По результатам исследований оформлен и получен патент № 2821028 на «Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц.

Оценка содержания диссертации, её завершенности. Диссертационная работа изложена на 121 странице, содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, 14 приложений, 22 таблицы и 8 рисунков. Список использованной литературы включает 176 источников, из них 160 иностранных.

Введение содержит информацию об актуальности темы диссертационной работы, степени разработанности проблемы, научной новизне, теоретической и практической значимости работы, степени достоверности и апробации результатов, а также включает цель и задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

Раздел «Обзор литературы» включает основные сведения о вирусе ньюкаслской болезни: его строении, таксономическом положении, факторах вирулентности и жизненном цикле. Также подробно описано генетическое разнообразие штаммов и изолятов ВНБ, в том числе сведения о системах классификации и распространении различных генетических групп вируса в мире и в России.

В подразделе «Материалы и методы» подробно описаны используемые автором методики, а также представлена информация об оборудовании и реактивах.

В разделе «Результаты собственных исследований и их обсуждение» последовательно и в логическом порядке представлены все этапы исследовательской работы. Экспериментальные данные и их обсуждение представлены корректно и приведены в сравнительном контексте.

В разделе «Заключение» представлены выводы, практические предложения и перспективы дальнейшей разработки темы. Выводы четко сформулированы и логично завершают исследование, что свидетельствует о выполнении поставленных цели и задач исследования, а также о высоком уровне научной и профессиональной подготовки соискателя.

В диссертационной работе автор ссылается на 176 источников, в том числе 160 иностранных.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертационной работы.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие вопросы и замечания:

- 1) При приготовлении суспензии из органов птиц на основании чего было принято решение, что для подготовки к вирусовыделению достаточно измельчения ножницами пробы без перетирания со стерильным кварцевым песком или другими абразивами?

- 2) Если все исследуемые штаммы при заражении куриных эмбрионов вызывали их гибель, не логичнее ли было бы использовать в качестве обозначения эффективной дозы ЭЛД₅₀ вместо ЭИД₅₀?
- 3) На основании чего было принято решение о времени элонгации свыше 4 минут при подборе параметров первой стадии ПЦР для амплификации фрагментов генов F и HN изолятов ВНБ генотипа VII?
- 4) Почему для сравнительного анализа полных нуклеотидных последовательностей ВБН VII генотипа была взята только последовательность из Ирана? Других последовательностей полного генома данного генотипа не представлено в открытых базах данных?
- 5) В качестве одного из примеров практического внедрения результатов представлены методические рекомендации по определению последовательности ДНК с помощью реакции секвенирования на генетическом анализаторе НАНОФОР-05. При этом в работе не указан этот анализатор в перечне оборудования и нет примеров протоколов исследования в тексте работы. Не представляется возможным понять, насколько исследования автора легли в основу данных рекомендаций.
- 6) В работе присутствует некоторое количество стилистических и орфографических ошибок.

Сделанные замечания не влияют на положительную оценку и значимость работы, а вопросы носят дискуссионный характер.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Диссертационная работа Гусевой Нелли Андреевны «Молекулярно-генетические свойства изолятов вируса болезни Ньюкасла, выявленных на территории Российской Федерации в 2019-2023 гг.» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную на высоком научно-методическом уровне, в которой содержатся результаты по изучению десяти штаммов вируса ньюкаслской болезни, имеющие научное и практическое значение для развития ветеринарной вирусологии.

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. В диссертации приводятся сведения о практической значимости полученных результатов.

Всё это говорит о том, что Гусева Н.А. является высоко квалифицированным специалистом, владеющим современными молекулярно-генетическими, вирусологическими и статистическими методами исследований.

По актуальности, новизне, объёму проведенных исследований; степени достоверности и значимости результатов диссертационная работа заслуживает положительной оценки и соответствует требованиям, установленным разделом II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением

Маркин Сергей