

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Лартона Ростислава Рустамовича «Разработка мультиплексной полимеразно-цепной реакции (обратная транскрипция) для лабораторной диагностики респираторных вирусных инфекций (инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3)»,

представленной в диссертационный совет Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Актуальность темы. Широкая распространенность и наносимый ущерб респираторных инфекций крупного рогатого скота обуславливает необходимость разработки новых и совершенствование существующих методов и средств лабораторной диагностики и специфической профилактики. В диагностике инфекционных болезней важное значение имеет выявление возбудителей. Молекулярно-генетические методы, обладая высокой чувствительностью и специфичностью, обеспечивают индикацию и идентификацию генома возбудителей за короткий промежуток времени. Метод ПЦР-диагностики с помощью мультиплексных тест-систем (на несколько инфекций) с успехом используется в диагностике более одной целевой последовательности в клиническом образце, которые могут быть совместно амплифицированы в одной пробирке. Успех мультиплексной реакции ПЦР зависит от конструкции конкретных используемых праймеров, некомплементарных друг другу, предпочтительно, имеющих сходные температуры отжига чтобы избежать праймер-димеров и неэффективных реакций. Также важным условием оптимизации мультиплексной ПЦР является соотношение праймеров, поскольку присутствие в смеси более чем одной пары увеличивает возможность амплификации неспецифических продуктов и снижает чувствительность реакции в связи с конкуренцией за компоненты реакционной смеси при синтезе нескольких ампликонов.

Создание мультиплексной тест-системы для обнаружения нуклеиновых кислот возбудителей инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 (ИРТ, ВД, ПГ-3), зачастую имеющих широкое распространение, является важной и актуальной целью данной диссертационной работы.

Для решения выбранной и определенной автором цели поставлены 5 задач.

Научная новизна. Впервые на основании сравнительного анализа нуклеотидной последовательности исследуемых возбудителей установлены наиболее консервативные локусы для каждого вида возбудителей, использованные в качестве маркерных фрагментов. Разработаны оптимальные условия проведения мультиплексной ПЦР с подобранными праймерами. Разработана мультиплексная ПЦР тест-система, позволяющая одновременное выявление, идентификацию геномов возбудителей респираторных инфекций (инфекционный ринотрахеит, парагрипп-3, вирусная диарея) в биологических объектах.

Теоретическая и практическая значимость. Подобранные праймеры, зонды и разработанная технология проведения мультиплексной ПЦР обеспечивают одновременное выявление наличия геномов возбудителей (ИРТ, ПГ-3, ВД), что имеет важное теоретическое и практическое значение. Результаты исследований дополняют существующие представления по амплификации геномов возбудителей респираторных инфекций и могут быть использованы в диагностике этих болезней. Созданный набор и технология проведения мультиплексной ПЦР обладает высокой специфичностью и обеспечивает диагностику искомым возбудителей.

Степень обоснованности, достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Методические подходы, использованные автором, отвечают высокому уровню современных исследований. Обоснованность и достоверность полученных данных подтверждены воспроизводимостью результатов, объемом экспериментальных исследований. Полученные в результате экспериментальной работы научные данные обобщены и всесторонне проанализированы, что позволило сформулировать выносимые на защиту основные научные положения, выводы диссертационной работы Лартона Р.Р.

Общая оценка работы и ее соответствие требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация Лартона Р.Р. представляет собой важное, интересное и профессионально выполненное исследование, соответствующее статусу научно-квалификационной работы. Полученные в диссертационной работе данные отражены в 5 статьях в журналах, включённых в перечень ВАК России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук. Материалы диссертации обсуждены и доложены и одобрены на Международных и Всероссийских научных конференциях. Материалы ежегодных исследований были доложены при работе семинаров и научных конференций, что говорит о должном уровне их

апробации. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы.

Структура и анализ содержания диссертационной работы. Диссертационная работа Лартона Р.Р. написана научным языком, изложена на 106 страницах компьютерного текста, включает введение, обзор литературы, описание методики исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключение, выводов, списка сокращений практические предложения, список использованной литературы, приложение. Список литературы включает 178 источников, в т.ч. 85 отечественных и 93 иностранных. Диссертационная работа проиллюстрирована 7 рисунками и 5 таблицами, которые подтверждают достоверность результатов и облегчают восприятие материала.

В разделе **Введение** обоснована актуальность темы диссертационной работы, выдвинуты конкретные цели и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов, сведения об апробации работы и публикации, основные положения выносимые на защиту, объем и структура диссертации.

В разделе **Обзор литературы** дана подробная и компетентная характеристика респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота, распространенность их в Российской Федерации и в мире, подробно описано, методы диагностики и лечения, а также мероприятия по борьбе с респираторными инфекциями, морфологическое строение изучаемых вирусов.

В разделе **Материалы и методы исследований** представлены основные методы и материалы исследований и технология проведения соответствующих молекулярно-генетических исследований. Используемые материалы и методы соответствуют современному уровню исследований и обеспечили возможность решения поставленных цели и задач.

В разделе **Результаты собственных исследований** отражены проведенные исследования, а именно анализ, создание, лабораторные испытания ПЦР тест-систем. Дана обоснованная оценка эффективности разработанных наборов и технологий, доказана обоснованность полученных результатов. Выдвинутые задачи успешно решены на основе современных методов. Полученные автором данные имеют теоретическое и практическое значение, которые повышают эффективность диагностики широко распространенных респираторных болезней крупного рогатого скота.

В разделе **Заключение** представлен анализ полученных результатов с квалифицированной интерпретацией литературных источников и сформулированы выводы.

В целом положительно оценивая работу, хотелось уточнить отдельные вопросы, высказать некоторые пожелания и замечания, возникшие в ходе ознакомления с диссертационной работой.

В работе имеются отдельные стилистические и орфографические ошибки, не согласованные предложения (п. 2.2.2). Имеются замечания по оформлению иллюстраций: отсутствуют дополнительные пояснения под рисунками №№ 1, 2, 3, 5. Согласно положениям ГОСТ 7.32-2017 в разделе Приложение разрешается размещать рисунки, на которые оформлена ссылка в основном тексте. На все рисунки в приложении составляется свое название.

В списке сокращений отсутствует расшифровка аббревиатур BPG32; BVDV1 и BHV11 - консервативных участков локусов исследуемых возбудителей

Выводы 1, 2, 4 носят повествовательный характер, без цифрового подтверждения аналитической оценки проведенного исследования.

На наш взгляд:

- в литературном обзоре большое внимание отведено освещению вопросов эпизоотологии, диагностики и профилактики изучаемых болезней, без акцента на перспективность выбора определенных специфичных мультикопийных маркерных участков геномов изучаемых вирусов из «выявленных у возбудителя ИРТ – 7, ПГ-3 – 10, ВД – 14 наиболее консервативных участков». Какие диагностически значимые белки (или их фрагменты) они кодируют? Лишь в Приложении «Временные ветеринарные правила по генотипированию вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота» указан используемый участок *матричного гена (M гена)* вируса парагриппа-3 длиной 328 п.н.;

- в разделе Приложение не следовало приводить полный текст «Временных ветеринарных правил...» достаточно было представить титульный лист и список авторов-разработчиков.

В диссертационной работе не представлены данные изучения перекрестной специфичности разработанной ПЦР тест-системы в отношении близкородственных видов представителей: герпесвирусов КРС – 2, 3, 4; флавивирусов – пограничной болезни и генотипов вируса ПГ-3.

Также возникли некоторые вопросы, требующие пояснения.

Учитывая носительство вирусов ИРТ, ПГ-3 и ВД после заражения и вакцинации аттенуированными штаммами, персистентность данных вирусов. Позволяет ли разработанная Вами мультиплексная ПЦР тест-система проведение исследований DIVA стратегии?

Автор пишет: «...соотношение специфических компонентов подбирались эмпирическим путем». Однако результаты подбора оптимального соотношения «олигонуклеотидных затравок, для выявления

одного из искомым вирусом» не показаны. В работе представлен лишь конечный результат (таблица 3). В каком, установленном Вами, соотношении должны добавляться в реакционную смесь подобранные Вами праймеры к ИРТ, ПГ-3 и ВД?

Вы отмечаете, что чувствительность разработанной мультиплексной ПЦР составляет 1-10 геномов. На сколько данная чувствительность воспроизводима и какие факторы могут влиять на нее?

Сформулированные замечания и вопросы не носят принципиальный характер, они вызваны интересом к данной работе и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

Заключение.

Представленная диссертационная работа Лартона Р. Р. является законченной научно-квалификационной работой, посвящена решению актуальной задачи, имеющей важное значение в научном и практическом плане, и направлена на решение актуальной проблемы в области ветеринарной медицины.

По актуальности темы, объему проведенных исследований теоретической, практической значимости результатов и их обоснованности диссертационная работа Лартона Р. Р. вполне отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Лартон Ростислав Рустамович заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунологии
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
доктор ветеринарных наук, доцент

О. В. Капустина

Подпись Капустиной Ольги Владимировны подтверждаю:

Ученый секретарь
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
кандидат биологических наук
10.06.2022г.



Ю. Г. Исаев

Адрес организации: 109428, Москва, Рязанский проспект, д.24, корпус 1.
Тел./Факс +7(495) 970-03-68. E-mail: admin@viev.ru
olgakapustina2010@yandex.ru, тел. 89157942133