

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук
Генералова Сергея Вячеславовича на диссертационную работу
Маниесона Виктора Эммануэля Нии Одотеи Ньюмода на тему
**«Создание иммуноферментной тест-системы на основе антител к
диметилсульфоксид-антигену *Yersinia pseudotuberculosis* для индикации
энтеропатогенных иерсиний у сельскохозяйственных животных»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Актуальность темы

Заболевания, вызываемые бактериями *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*, относятся к эмерджентным инфекциям, способным появляться внезапно, без видимых предвестников. В 2021 году, согласно данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации» суммарный экономический ущерб от указанных инфекционных заболеваний составил около 75 миллионов рублей. Для предупреждения распространения инфекций необходимым является разработка и совершенствование средств и методов экспресс-диагностики их возбудителей. Необходимо отметить, что бактерии *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* часто циркулируют совместно, поэтому в некоторых случаях целесообразна родовая, а не видовая идентификация бактерий. Исследования настоящей диссертации направлены на поиск оптимальных решений в вопросах конструирования средств диагностики заболеваний сельскохозяйственных животных, вызываемых энтеропатогенными бактериями рода *Yersinia*. В связи с этим тема диссертационной работы Маниесона В. Э. Н. О. Н. несомненно является актуальной и соответствует п. 4 паспорта научной специальности «4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных».

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций диссертации, их достоверность и новизна, теоретическая и практическая значимость

Автор диссертации впервые выделил антигенную фракцию из бактериальной культуры *Y. pseudotuberculosis* с применением диметилсульфоксида, которую охарактеризовал как субстанцию, позволяющую получать иммунную сыворотку, содержащую высокий титр антител к бактериями рода *Yersinia*. Дополнительно автор разработал схемы иммунизации кроликов и морских свинок, включающие использование полиазолидинаммония и золотых наночастиц в качестве адъювантов. Полученные результаты позволили автору сконструировать тест-систему для проведения иммуноферментного анализа бактерий рода *Yersinia*, необходимую для экспресс-диагностики заболеваний животных, предположительно вызванных указанными возбудителями. Разработанная тест-система успешно прошла испытания в аграрных комплексах Саратовской области, ее применение позволило сократить время проведения диагностического исследования с использованием бактериологических методов с 6 до 3 суток, при этом повысив эффективность анализа на 50%.

Результаты работы существенно дополняют научные данные о получении бактериальных антигенов, а также данные об их совместном использовании с современными адъювантами и влиянии на организм животного. Применение полученных результатов целесообразно не только в ветеринарии, но и в разделах биотехнологии, посвященных разработке диагностических препаратов на основе антител.

При выполнении работы автор использовал микробиологические, биологические, иммунохимические методы. Результаты, полученные в ходе исследования, статистически обработаны. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Оценка содержания, степени завершенности диссертационной работы и качества ее оформления

Материалы диссертационного исследования изложены на 129 страницах печатного текста. Диссертация написана по классической схеме и состоит из разделов: введение, обзор литературы, собственные исследования,

заключение, выводы, практические предложения, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, приложение. При этом раздел с описанием собственных исследований включает подразделы: материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение.

При написании работы использован 251 литературный источник. Диссертация иллюстрирована 2 рисунками и 21 таблицей, отражающими основное содержание выполненных исследований.

В разделе «Введение» автором обоснованы актуальность использования серологических методов для диагностики возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза, а также необходимость расширения спектра средств для их диагностики. На данном основании автором определены цель, задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» состоит из четырех разделов, в которых подробно изложены систематика, особенности распространения и циркуляции энтеропатогенных иерсиний среди животных и людей. Подробно описаны актуальные методы лабораторной диагностики иерсиний, проведен анализ литературных источников, касающихся исследования белковых и полисахаридных антигенов возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза. Отдельно изучен вопрос использования современных и традиционных адъювантов, применяемых с целью получения гипериммунных сывороток. Подготовленный литературный обзор позволил автору сделать логические предпосылки для проведения исследований с целью получения гипериммунных сывороток к комплексному антигену псевдотуберкулезного микроба с применением полиэлектролитов и золотых наночастиц в качестве адъювантов.

Описанию материалов и методов исследования посвящена первая часть главы «Собственные исследования», в которой автором представлены перечни используемых в работе штаммов микроорганизмов, коммерческих питательных сред, коммерческих диагностических препаратов. Подробно описаны методы работы с животными, включающие также методы исследования влияния антигенов на организм животного, методы приготовления материалов для иммунизации, способы оценки вирулентных

свойств иерсиний, методы оценки активности выделенных антигенов и полученных сывороток.

Описанию результатов и обсуждению собственных исследований посвящена вторая часть главы «Собственные исследования», состоящая из восьми подразделов.

В подразделах 2.2.1 и 2.2.2 приведена характеристика антигена полученного из культуры *Y. pseudotuberculosis* с применением диметилсульфоксида. Особенности указанного антигена является преобладание в его составе белков с молекулярными массами 45, 38, 20 и 17 кДа, из которых наиболее иммуногенным, по-видимому, является белок с молекулярной массой 38 кДа. Антигенная активность к сывороткам, полученным к антигенам патогенных иерсиний, составила не менее 1:12800, при этом при взаимодействии с сыворотками, полученным к другим бактериям (эшерихии, сальмонеллы, бруцеллы), титр не превышал значения 1:1600. Полученные результаты позволили охарактеризовать полученный антиген, как специфичный к сывороткам, содержащим антитела к энтеропатогенным бактериям рода *Yersinia*, и использовать его при дальнейшем конструировании тест-системы для иммуноферментного анализа.

Подразделы 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5 главы «Собственные исследования» посвящены изучению адьювантного действия модифицированного полиазолидинаммония и золотых наночастиц при введении антигена, полученного от бактерий *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* морским свинкам и кроликам. В ходе исследований автор установил оптимальную концентрацию полиазолидинаммония, получил данные по воздействию адьювантов на активность получаемых сывороток, а также на состояние клеточного иммунитета животных.

Подразделы 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8 главы «Собственные исследования» относятся к разработке и испытанию тест-системы для иммуноферментного анализа при определении бактерий рода *Yersinia* в культурах микроорганизмов, выделенных от животных, подозрительных на иерсиниоз и псевдотуберкулез. Автору успешно удалось применить результаты, полученные в ходе предыдущих исследований, для обоснования прототипа иммуноферментной тест-системы, позволяющей определять бактерии рода

Yersinia в пробах на уровне 10^7 - 10^9 клеток на мл взвеси. Между тем, автор показывает целесообразность применения разработанной тест-системы в условиях животноводческого комплекса в дополнение к бактериологическому методу с целью сокращения времени проведения и повышения чувствительности диагностических мероприятий.

Разделы «Заключение», «Выводы», «Практические предложения» и «Перспективы дальнейшей разработки темы» являются логическим завершением диссертационной работы. В разделе «Заключение» автор проводит аргументированный анализ полученных результатов, отмечая преимущества использования сконструированной тест-системы для диагностики заболеваний сельскохозяйственных животных, вызванных бактериями рода *Yersinia*, при одновременном использовании традиционного бактериологического метода. Содержание раздела «Выводы» адекватно количеству и содержанию основных положений диссертации, выносимых на защиту. В разделах «Практические предложения» и «Перспективы дальнейшей разработки темы» автором обозначены направления применения полученных результатов в практической и исследовательской сферах. В виде приложения к диссертации ее автор приводит разработанную инструкцию по применению разработанной им иммуноферментной тест-системы для ускоренного выявления возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза животных в среде накопления, утвержденную в ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ».

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из которых 3 опубликовано в изданиях, индексируемых международной базой данных Scopus, 9 публикаций изданы в сборниках материалов конференций национального и международного уровней, что позволяет высоко оценить уровень апробации полученных результатов.

Содержание автореферата практически полностью соответствует основному содержанию диссертации.

В целом диссертация Маниесона В.Э.Н.О.Н. является законченным исследованием, представляет решение актуальных задач, объединенных общим подходом, направленным на развитие диагностики иерсиниоза и псевдотуберкулеза с применением сконструированной им тест-системой для иммуноферментного анализа.

Вместе с тем к автору диссертации есть несколько вопросов и замечаний:

1) Целью работы диссертации является «создание родоспецифической иммуноферментной тест-системы», при этом исследование родовой специфичности основано на исследовании *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Почему отсутствуют данные относительно других бактерий рода *Yersinia*, например патогенных бактерий вида *Y. ruckeri* ?

2) В обзоре литературы приведено подробное описание белковых и полисахаридных антигенов бактерий рода *Yersinia*. К каким на взгляд автора белкам могут быть отнесены компоненты антигенного комплекса, выделенного от иерсиний с применением диметилсульфоксида? Будут ли впоследствии изучены свойства отдельных белковых фракций, входящих в состав антигена?

3) Какие прогнозы может сделать автор относительно применения разработанной иммуноферментной тест-системы, принимая во внимание обстоятельство распространения высокочувствительных генетических методов исследования?

4) В работе присутствуют опечатки, не совсем удачные сокращения и стилистические обороты, литературные клише. Например, сокращение «ПААГ», используемое в диссертации для обозначения модифицированного полиазилидиламмония, во многих публикациях по микробиологии обычно обозначает «полиакриламидный гель»; в оглавлении диссертации под разделом «Примечание» видимо подразумевается раздел «Приложение». Некоторые данные желательно проиллюстрировать не в таблицах, а в графиках или диаграммах. На странице 8 автор отмечает, что «работа проводилась с использованием комплексного анализа и системного подхода», тем не менее, возникает вопрос, что именно подвергали комплексному анализу и к чему применяли системный подход?


Следует отметить, что вышеперечисленные замечания не снижают общую положительную оценку и научно-практическую значимость исследования.

Заключение

По актуальности избранной темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне диссертационное исследование Маниесона Виктора Эммануэля Нии Одотеи Ньомода на тему «Создание иммуноферментной тест-системы на основе антител к диметилсульфоксид-

антигену *Yersinia pseudotuberculosis* для индикации энтеропатогенных иерсиний у сельскохозяйственных животных» соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемых к кандидатской диссертации, а ее автор, Маниесон Виктор Эммануэль Нии Одотеи Ньомод, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных.

Официальный оппонент
кандидат биологических наук
по специальности 1.5.6 – биотехнология,
ведущий научный сотрудник
лаборатории профилактических иммуноглобулинов
Федерального казенного учреждения науки
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
(ФКУН Российский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора)



Генералов Сергей Вячеславович

30 декабря 2022 г.

Почтовый адрес организации: 410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46
Контактный телефон: +7 (8452) 51-54-46
e-mail: rusrapi@microbe.ru; svgeneraloff@gmail.com

Подпись С.В. Генералова заверяю

Начальник отдела кадров
ФКУН Российский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора



Шумигай О.В.