

## ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук  
Генералова Сергея Вячеславовича на диссертационную работу  
Кузнецовой Веры Сергеевны на тему  
**«Создание экспериментальной иммуноферментной тест-системы  
и её дот-варианта для индикации *Yersinia pseudotuberculosis* у  
сельскохозяйственных животных»**,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

### **Актуальность темы**

Несмотря на снижение в России заболеваемости псевдотуберкулезом среди людей в 2022 году более чем в три раза, нельзя исключать вероятности появления внезапных вспышек этой болезни. Заболеваемость людей псевдотуберкулезом тесно связана с качеством сельскохозяйственной продукции, следовательно, совершенствование диагностики псевдотуберкулеза для своевременного обнаружения на предприятиях агропромышленного комплекса больных животных, а также мониторинга объектов внешней среды, воды, кормов и др. является достаточно важной задачей. В настоящей диссертации осуществляется поиск решений для данного вопроса, поэтому тема работы представляется актуальной и соответствует пунктам 4, 7 и 16 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**

Автором впервые предложены схемы многократной иммунизации лабораторных животных дезинтегрированными мембранами и липополисахаридами *Yersinia pseudotuberculosis* с применением адъюванта полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода. Предлагаемое решение позволило автору получить активные антитела, специфичные к исследуемому комплексу антигенов и разработать



диагностические тест-системы на основе иммуноферментного анализа и до-иммуноанализа с использованием золотых наночастиц для индикации различных серовариантов *Y. pseudotuberculosis*. Для применения сконструированных тест-систем разработаны соответствующие инструкции, а сами тест-системы успешно прошли испытания на предприятии агропромышленного комплекса Саратовской области, их применение позволило повысить эффективность диагностических исследований на 40%.

Результаты работы существенно дополняют научные данные о составе мембраны бактерий рода *Yersinia*, получении бактериальных антигенов, влиянии исследуемых антигенов и адьювантов 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 145 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, приложения. Раздел с описанием собственных исследований включает подразделы: материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение.

При написании работы использовано 225 литературных источников. Диссертация иллюстрирована 6 рисунками и 18 таблицами, отражающими основное содержание выполненных исследований.

В разделе «Введение» автором обоснованы актуальность использования серологических методов для диагностики возбудителя псевдотуберкулеза, а также необходимость расширения спектра средств и



методов для его 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 особенности распространения и циркуляции возбудителя псевдотуберкулеза среди животных и людей, при этом подчеркивается, что массовый мониторинг псевдотуберкулеза у сельскохозяйственных животных тесно связан с профилактикой этой болезни у человека. Подробно описаны актуальные методы лабораторной диагностики патогенных иерсиний, проведен анализ литературных источников, касающихся применения диагностических средств для выявления возбудителей псевдотуберкулеза. Автором сделан вывод о недостаточности сравнительно недорогих коммерческих диагностических тест-систем, предназначенных для выявления псевдотуберкулезных бактерий в ветеринарных лабораториях. В литературном обзоре подробно представлены сведения об антигенном составе иерсиний, а также изучен вопрос о применении различных адъювантов с целью получения гипериммунных сывороток. Подготовленный литературный обзор позволил автору сделать логические предпосылки для проведения исследований с целью получения гипериммунных сывороток к антигенам клеточной стенки псевдотуберкулезного микроба с применением полиэлектролитов в качестве адъювантов.

Описанию материалов и методов исследования посвящена первая часть главы «Собственные исследования», в которой автором представлены перечни используемых в работе штаммов микроорганизмов, питательных сред, диагностических препаратов. Подробно описаны методы работы с животными, включающие методы получения гипериммунных сывороток, методы приготовления материалов для иммунизации, способы получения конъюгатов и конструирования тест-систем для иммунологического определения возбудителей псевдотуберкулеза.

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

Результаты, представленные в подразделах 2.2.1 и 2.2.2 касаются исследования белков дезинтегрированных мембран *Y. pseudotuberculosis*.



Белки дезинтегрированных мембран охарактеризованы по молекулярной массе, видовой и родовой специфичности, а также по способности вызывать иммунный ответ у лабораторных животных. При этом автор экспериментально получает новые и уточняет некоторые известные данные о составе и свойствах белков дезинтегрированных мембран *Y. pseudotuberculosis*. В подразделе 2.2.3 рассматривается возможность применения липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* в качестве альтернативного антигена при конструировании диагностической тест-системы. Для этого автором проведены исследования по изучению химической характеристики указанного липополисахарида и его влиянию на иммунную систему белых мышей. В подразделах с 2.2.4 по 2.2.6 приведены результаты исследований, подтверждающие целесообразность применения модифицированного полиазолидиламмония в качестве адьюванта при получении сывороток от различных лабораторных животных к липополисахаридам и протеинам клеточной стенки *Y. pseudotuberculosis*. Автору удалось подобрать дозы адьюванта и антигенов, позволяющие получать соответствующие сыворотки, которые превосходили по активности коммерческие сыворотки, специфичные к бактериям *Y. pseudotuberculosis*. Дополнительно получены новые результаты о влиянии компонентов, используемых для иммунизации, на организм животных, установлена токсичная доза липополисахаридов *Y. pseudotuberculosis* для кроликов.

В подразделах с 2.2.7 по 2.2.9 приведены результаты исследований, относящихся непосредственно к конструированию тест-систем на основе иммуноферментного и дот-иммуноанализа. Автором охарактеризованы чувствительность и специфичность предлагаемых тест-систем, а также предложен алгоритм проведения диагностических исследований с их использованием.

Содержание подразделов 2.2.10 и 2.2.11 посвящено практическим испытаниям разработанных тест-систем, выполненных на предприятиях агропромышленного комплекса Саратовской области. Автор с применением бактериологического метода выявил потенциальные очаги псевдотуберкулезной инфекции, а затем испытал разработанные тест-системы. Используемый автором алгоритм исследования позволил доказать преимущество предлагаемых тест-систем перед стандартным



бактериологическим методом, широко используемым в практической деятельности.

Разделы «Заключение», «Выводы», «Практические предложения» и «Перспективы дальнейшей разработки темы» логично завершают диссертационную работу. В разделе «Заключение» автор проводит анализ полученных результатов, отмечая преимущества использования сконструированных тест-систем для диагностики псевдотуберкулеза в условиях предприятий агропромышленного комплекса.

Содержание раздела «Выводы» адекватно количеству и содержанию основных положений диссертации, выносимых на защиту. В разделах «Практические предложения» и «Перспективы дальнейшей разработки темы» автором обозначены возможности применения полученных результатов в практической и исследовательской сферах. В виде приложения к диссертации ее автор приводит инструкции по применению разработанных тест-систем для выявления возбудителей псевдотуберкулеза, утвержденные в ФГБОУ ВО Вавиловский университет, а также акты о выполненных исследованиях по выявлению возбудителя псевдотуберкулеза у крупного рогатого скота и свиней в условиях животноводческих хозяйств.

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, 2 из которых опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК, 5 работ опубликовано в изданиях, индексируемых международными базами данных Agris, Web of Science и Scopus, 5 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 Кузнецовой В.С. является законченным исследованием, представляет решение актуальных задач, объединенных общим подходом, направленным на развитие диагностики псевдотуберкулеза с применением сконструированных автором иммуноферментной тест-системы и ее дот-варианта.

Вместе с тем к автору диссертации есть несколько вопросов:

1) Практическим итогом работы явилось конструирование двух тест-систем. Какая из предложенных тест-систем предпочтительнее для дальнейшего использования и почему?

2) Позволяет ли хотя бы одна из предложенных автором тест-систем обнаружить возбудителя псевдотуберкулеза в концентрации меньшей, чем в



дозе, способной инфицировать человека или сельскохозяйственное животное?

3) Какие способы обеззараживания и инактивации применял автор при подготовке биологического материала для исследования и после завершения работы?

Есть и несколько замечаний к диссертации. В работе присутствуют опечатки и не совсем удачные сокращения. Например, сокращение «ПААГ», используемое в диссертации для обозначения полиазилидиламмония, часто обозначает «полиакриламидный гель». Сокращения в работе встречаются очень часто, в том числе и в заголовках разделов и подразделов. В последнем случае используемые сокращения затрудняют понимание и восприятие текста. При описании цели и задач исследований, а также научной новизны, автор указывает только один тип животных, применяемых для испытания разрабатываемых антител (указаны телята), однако спектр исследований оказался шире: помимо телят использовались также свиньи различного возраста, а также взрослые особи крупного рогатого скота. В обзоре литературы, на мой взгляд, ссылки в некоторых местах даны в избыточном количестве, их число лучше сократить или применить для другого материала. К рисункам желательно добавить комментарии: не совсем понятно, что обозначают стрелки на рисунке 1, каким компонентам соответствуют пики хроматограммы на рисунках 2 и 3? Следует отметить, что вышеперечисленные замечания не снижают общую положительную оценку и научно-практическую значимость исследования.

К положительным сторонам текста диссертации следует отнести тот большой объем исследований, который автору удалось аккуратно свести в таблицы и понятно донести до читателя. Краткие выводы, выполненные по каждому подразделу, позволяют лучше разобраться в обширном материале диссертации, также уместны представления разработанных инструкций к предлагаемым тест-системам в виде приложения к диссертации.

### **Заключение**

По актуальности избранной темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне диссертационное исследование Кузнецовой Веры Сергеевны на тему «Создание экспериментальной иммуноферментной тест-системы и её дот-варианта для индикации *Yersinia pseudotuberculosis* у сельскохозяйственных животных» соответствует критериям п. 9

«Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатской диссертации, а ее автор, Кузнецова Вера Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных.

Официальный оппонент  
кандидат биологических наук  
по специальности 03.00.23 – 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

25 апреля 2024 г.

Почтовый адрес организации: 410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46  
Контактный телефон: +7 (8452) 51-54-46  
e-mail: rusrap1@microbe.ru; svgeneraloff@gmail.com

Подпись С.В. Генералова заверяю

Начальник отдела кадров  
ФКУН Российский противочумный  
институт «Микроб» Роспотребнадзора



Шумигой О.В.