

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Серикбаевой Асии Демеухановны на диссертационную работу Жугунисова Куандыка Даулетбаевича на тему: «Совершенствование средств профилактики и технологии приготовления вакцины против блутанга», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология.

Актуальность темы исследования и её связь с общенаучными и общегосударственными программами

Анализ эпизоотологической ситуации показывает, что в последние годы ряд заболеваний животных широко распространяются, расширяя ареал традиционных, природных очагов регистрации. Из достаточно большого списка заболеваний особую тревогу вызывают болезни с потенциалом быстрого распространения, способные причинить огромные экономические потери. К категории данных инфекций относится новая экзотическая болезнь для Центральной Азии поражающая также несколько видов сельскохозяйственных животных называемая инфекционная катаральная лихорадка овец, известная также как блутанг (синий язык). Если проследить историю возникновения и распространения блутанга, то до второй половины XX века, основным ареалом присутствия инфекции являлся африканский континент. Однако с началом XXI века заболевание начало широко распространяться в Европу и не менее интенсивно в Азию. Поэтому в настоящее время перед мировым ветеринарным сообществом стоит задача предупреждения его дальнейшего распространения. В литературе имеются данные о выявлении положительных проб сывороток крови в Казахстане и у яков в Иссык-кульской области. Кроме того блутанг зарегистрирована и в России. В 2016 году появились первые сведения о наличии инфекции в Китае.

Одним из важных этапов для борьбы с инфекцией и предотвращения дальнейшего распространения вируса блутанга среди животных является своевременная диагностика и типирование данного возбудителя, с последующим проведением профилактических мероприятий.

Нестабильная эпизоотическая ситуация по блутангу в мире и отсутствие специфических профилактических препаратов из-за большого числа серотипов (известно 27 серотипов), не создающих у животных перекрёстного иммунитета, способствовало тому, что многие страны мира начали разработку своей технологии изготовления вакцины.

Поэтому, работа диссертанта по усовершенствованию технологии приготовления вакцины против блутанга в республике Казахстан, а также изучение ее иммунобиологических свойств на КРС и МРС является своевременной и актуальной.



Новизна исследования и научные результаты в рамках требований к диссертациям с учетом тенденций развития науки и техники, конкретное личное участие автора в полученных результатах

В работе представлены новые научно обоснованные теоретические результаты, которые имеют важное значение для развития научно-обоснованных программ по биотехнологии и ветеринарной вирусологии.

Диссертантом впервые были проведены исследования по оценке эпидемиологической ситуации блутанга на территории южных регионов Казахстана. По результатам проведённых исследований дана научно обоснованная оценка о распространении вируса блутанга, и в будущем о необходимости разработки специфических средств профилактики к предстоящим вспышкам болезни. В связи с этим, автором были теоретически обоснованы штамповые составы вакцины и экспериментально доказаны их пригодность для включения в состав вакцины по иммунобиологическим параметрам.

Диссертантом по результатам лабораторных исследований изучены технологические параметры получения и наработки вируса блутанга в культуре клеток суспензионным методом в крупномасштабном объеме. С использованием отработанных параметров крупномасштабного выращивания вируса наработаны 3 опытных серии вирусной суспензии, пригодная для приготовления вакцинного препарата.

Диссертантом отработаны параметры режима инаktivации вируса блутанга с использованием бета-пропиолактона. Данный технологический регламент (по инаktivации вируса блутанга) разработанный автором отработан в более чем 10-ти лабораториях и на 5 производственных условиях. Также подобрано в качестве эффективного иммуностимулятора новый коммерческий адъювант Montanide ISA-71VG на основе минерального масла для включения в состав вакцинного препарата против вируса блутанга. На основании установленных параметров составлены серии бивалентной вакцины против вируса блутанга. Изучена её стерильность, безвредность, авирулентность и иммуногенность на КРС и МРС. Определены иммунизирующая доза вакцины, изучено кратность и способ введения (подкожно, внутримышечно), безвредность, реактогенность и продолжительность иммунитета, а также сохраняемость вакцины.

Все полученные автором результаты подтверждены 5 авторскими свидетельствами выданными Министерством Юстиции Республики Казахстан.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертационная работа Жугунисова Куандыка Даулетбаевича «Совершенствование средств профилактики и технологии приготовления вакцины против блутанга» написана в соответствии с требованиями Положения ВАК Кыргызской Республики и является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой. Диссертация написана традиционно, материал изложен на 196 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, результаты собственных

исследований, заключения выводов, практических рекомендаций, библиографического списка использованной литературы (199 источников, в том числе 121 зарубежных авторов). Работа иллюстрирована 36 таблицами, 29 рисунками.

Во введении обоснована актуальность проблемы, цель и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, а также представлены сведения о публикациях автора, структуре и объеме диссертации.

Обзор литературы состоит из 12 разделов, содержащих информацию о распространении болезни, об экономическом ущербе, биологических свойствах вируса, эпизоотической ситуации, противоэпизоотических мероприятиях, о специфических профилактиках, а также информацию о традиционных технологиях изготовления вакцины против данной болезни.

В разделе «Материалы и методы» представлены наименование и количество штаммов вируса, культур клеток, животных, химреактивов, оборудования, методы исследования и статистической обработки полученных данных, а также технологии изготовления, контроля вакцинного препарата с целью профилактики и защиты животных от данной вирусной инфекции.

В «Собственных исследованиях» автором представлены следующие данные:

- проведены серологический мониторинг в южных регионах Казахстана, в ходе которого был определен эпидемиологический статус по блутангу. По итогам мониторинга установлено, что во всех пробах, отобранных среди различных видов животных самый высокий процент серопозитивности показал КРС, который является ключевым резервуаром в распространении вируса блутанга среди восприимчивых животных;

- отработаны параметры крупномасштабного суспензионного культивирования вируса блутанга в перевиваемой линии культуры клеток ВНК-21 с использованием следующих параметров: доза заражения от 0,1 до 1,0 ТЦД₅₀/кл, содержание сыворотки крови КРС - 5% в поддерживающей питательной среде, инкубирование при температуре 37°C в течение 120 час, позволяющие получать вирусосодержащую суспензию с биологической и антигенной активностью не ниже 6,50÷6,75 lgТЦД₅₀/см³ и 1:16, соответственно;

- для производственного выпуска инактивированной вакцины против блутанга впервые усовершенствован режим инактивации вируса бетапропиолактоном, который в конечной концентрации 0,1% инактивирует вирус при реакционной среде рН 7,0-7,4, а также при температуре 37 °С в течение 12 ч без потери антигенных свойств;

- использованы новый масляный адъювант Montanide ISA-71VG для приготовления инактивированной вакцины против блутанга. Данный адъювант оказался более эффективным для инактивированной бивалентной вакцины против блутанга по сравнению с гидроокисью алюминия и сапонином;

- разработаны схемы применения, сроки вакцинации животных, определены иммунизирующие дозы вакцины для КРС и МРС. Инактивированная бивалентная эмульгированная вакцина с новым масляным адъювантом Montanide ISA-71VG в дозе 1,0 мл (для МРС) или 2,0 мл (для КРС) при однократном внутримышечном иммунизации создает иммунитет у животных на 10 сут после вакцинации, который длится не менее 12 мес (срока наблюдения);

- разработанная инактивированная бивалентная эмульгированная вакцина против блутанга 4-го и 16-го серотипов сохраняет свои иммуногенные свойства при (2-8) °С в течение 12 мес.

Приложения информативны и отражают внедрение результатов в практическую ветеринарию. Положения, вынесенные диссертантом на защиту, соответствуют результатам собственных исследований, выводам и практическим предложениям. Материал изложен в логической последовательности, профессиональным языком.

Выводы диссертационной работы обоснованы и отражают заявленные цели и задачи. Основные положения и результаты работы, выносимые на защиту, четко формулируют научные достижения диссертанта.

Степень обоснованности и достоверности каждого результата (научного положения), выводов и заключения соискателя, сформулированных в диссертации.

Полученные диссертантом результаты достоверны, так как получены в результате глубокого анализа данной научной проблемы с использованием литературных источников отечественных и зарубежных авторов. Обоснованность и достоверность результатов, сформулированных в восьми выводах, вытекают из анализа большого объема фактического материала (29 таблицы и 36 рисунков), полученных с помощью современных биотехнологических, вирусологических, серологических, иммунологических и статистических методов.

Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором в диссертации, научно обоснованы и аргументированы. Теоретические и методические положения, а также практические рекомендации диссертационного исследования основываются на изучении фундаментальных и прикладных трудов отечественных и зарубежных ученых в области ветеринарной вирусологии и биотехнологии, что подтверждается ссылками на них в тексте диссертационной работы. В первой главе диссертации автором проводится глубокий анализ распространения болезни, перечень специфических вакцинных препаратов разработанные в мире, также приведены традиционные методов технологии приготовления инактивированной вакцины. В главе 2 «Материалы и методы исследований» приведены объект исследования, а также вирусологические, биотехнологические и иммунологические методы. В третьей главе диссертационного исследования на основе фактического и статистического материала проведена статистическая обработка полученных результатов. Для обоснования распространения вируса блутанга на территории южных

регионов Казахстана автором отобраны и изучены 730 проб сыворотки крови от КРС и МРС. В том числе в Алматинской области – 110 проб от КРС (26,19 %) и 310 проб от МРС (73,81 %), также соответственно из Жамбылской области – 50 проб от КРС (26,32 %) и 140 МРС (73,68 %), в Туркестанской области – 30 КРС (25,0 %) и 90 МРС (67,5 %). Результаты достоверны, так как доставленные пробы изучены с помощью серологического метода. Результаты проведенных исследований показывают, что антитела к структурному белку VP7 вируса БТ содержатся в сыворотке крови исследованных животных южных областей Казахстана. С помощью real time-ПЦР показано, что в положительных пробах обнаруживаются РНК вируса блутанга. Анализ полученных результатов свидетельствуют о наличии вируса среди данных видов животных.

С целью подбора штамма необходимого для конструирования инактивированной вакцины против данной инфекции, К.Д. Жугунисовым были изучены иммунобиологические свойства вируса блутанга. По общепринятому представлению для таких целей следует выбрать штамм, который является апатогенным, т.е. активно размножается в различных типах тканевых культур с проявлением цитопатогенного действия и обладает высокой иммуногенной активностью. Кроме того, штамм должен быть эпидемически актуальным для включения в состав вакцины и выделен из местных эпизоотических очагов. С учетом этих требований в серии экспериментов сравнивали патогенность, культуральные и иммуногенные свойства различных штаммов ВБТ. С этой целью в экспериментах были использованы штаммы, хранящиеся в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» НИИПББ. В результате проведенных исследований автором, установлено, что среди рассматриваемых групп эпизоотических штаммов вируса БТ, штаммы ВБТ4 и ВБТ16 являются наиболее подходящими для приготовления инактивированной вакцины. Полученные результаты обоснованы тем, что эти штаммы совершенно апатогенны для овец, проявляют наибольшую активность к размножению в культурах клеток и, что очень важно, обладают достаточно высокой иммуногенной активностью. Также они являются эпидемически актуальными для стран Центральной Азии, так как данные штаммы выделены в Таджикистане во время мониторинговых исследований в 2007 году.

Автором разработан технологический регламент получения высокоактивной вирусной суспензии, включающий следующие параметры: концентрация сыворотки в поддерживающей среде 5 %; заражающая доза вируса в пределах 0,1-0,2 ТЦД₅₀/кл; температура культивирования (36,5 ± 0,5) 0С; продолжительность культивирования 120 ч. Результат обоснован необходимостью получения высокоактивного вирусного материала для приготовления вакцины. При соблюдении указанных параметров культивирования можно стабильно получать вируссодержащую суспензию с биологической и антигенной активностью не ниже 6,0 lg ТЦД₅₀/мл и 1:16, пригодную для изготовления инактивированной вакцины против БТ.

Соискателем также были проведены исследования по инаktivации вируса блутанга БПЛ в разных концентрациях при различных температурных режимах. На основании проведенных исследований оптимальными параметрами инаktivации БПЛ ВБТ являются: конечная концентрация инаktivанта 0,1 %, температура реакционной среды ($37 \pm 0,5$) 0С, значение pH реакционной среды (7,0-7,4), продолжительность инаktivации 12 час. Полученные автором результаты обоснованы и согласуются с литературными данными. Результаты были статистически достоверны ($P < 0,05$) и воспроизведены в не менее 10 экспериментах в лабораторных условиях, а также 5 крупномасштабных наработках вируса в производственных условиях.

Подбор эффективных адьювантов проводился согласно литературным источникам, их безопасность и иммуногенная эффективность в составе вакцины доказаны на естественно восприимчивых животных.

Научная доказательность разработанной технологии приготовления данной вакцины подтверждена путем апробации в лабораторных условиях и Авторскими правами, Патентами на изобретения. Научные положения и заключения исходят из сущности работы и обоснованы результатами исследования. Полученные результаты прошли статистическую обработку, и позволяют считать представленные в диссертации данные достоверными, дающими право на формулировку основных положений, выносимых на защиту и заключений.

Оценка внутреннего единства полученных результатов

Диссертационное исследование Жугунисова К.Д. представляет собой целостную, содержательную работу, выполненную с использованием достаточного объема теоретического и эмпирического материалов. Выбранная автором структура диссертационной работы обеспечила возможность достижения поставленных цели и задач исследования. Теоретическая и практическая ценность работы объективно predetermined многочисленными исследованиями, связанными с получением высокоактивной инаktivированной вирусной биомассы с максимальным сохранением его антигенной активности, подбором эффективного адьюванта и проведением иммунизации целевых животных с разработанной вакциной.

Структура исследования также научно и логически оправдана. Проблематика отдельных глав тесно увязана с основной темой диссертации. Выводы по каждой главе самостоятельны и вместе с тем взаимосвязаны, дополняют и усиливают содержание друг друга. Сформулированные в заключении развернутые выводы соотносятся с положениями, выносимыми на защиту, и с промежуточными выводами, помещенными в конце каждого раздела, но не дублируют их. Заключение имеет строгое, компактное воссоздание основных научных результатов работы. В целом, работа написана на достаточно высоком исследовательском уровне, ее отличает легкость восприятия, строгая логичная последовательность изложения материала и внутреннее единство полученных результатов.

Таким образом, научные результаты, полученные в ходе диссертационного исследования К.Д. Жугунисова, логически последовательны, научно обоснованы и характеризуются внутренним единством.

Практическая значимость полученных результатов

Диссертантом для ветеринарной практики даны комплект НТД на вакцину, включающий:

- Стандарт организации на вакцину (СТ 405-1919-04 ГП-070-2011 Вакцина инактивированная эмульгированная против блутанга).
- Временную инструкцию по изготовлению и контролю вакцины инактивированной бивалентную эмульгированной против блутанга.
- Временную инструкцию по применению вакцины инактивированной бивалентной эмульгированной против блутанга.

В целом работа выполнена на большем фактическом материале и внесет безусловный значительный научный вклад в развитии таких важных прикладных отраслей биотехнологии и ветеринарии как профилактики, мониторинг болезней животных, в частности в разработке средств против вирусных заболеваний.

Подтверждение опубликования основных положений, результатов, выводы и заключения диссертации

Основные материалы диссертации доложены на международных научно-практических конференциях, посвященных 50-летию образования НИИПББ (г.Алматы, 2008 г.), I-й международной конференции Астана БиоТех (г.Астана, 2008 г.), IV международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии" (г.Павлодар, 2008 г.), II-й международной конференции Астана БиоТех (г.Астана, 2011 г.), международной научно-практической конференции «Современные проблемы борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных» посвященной 70-летию профессора Н.Асанова, (г.Алматы, 2012 г.).

По материалам диссертационной работы опубликовано 11 научных трудов, в том числе 6 статьи и 5 патента.

Соответствие диссертации специальности. Содержание диссертационной работы Жугунисова К.Д. на тему «Совершенствование средств профилактики и технологии приготовления вакцины против блутанга» на соискание ученой степени кандидата биологических наук полностью соответствует паспортам специальностей 03.01.06 – биотехнология.

Соответствие автореферата содержанию диссертации

Автореферат отражает содержание диссертации. Автореферат написан на русском языке, к которому приложены резюме на кыргызском и английском языках. Резюме содержит сведения об авторе, название темы диссертации, защита на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология.

