

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа», представленной на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальностям: 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ограниченный спектр серологических тестов (специфическая, но методически трудоемкая и длительная РН) для диагностики высоко контагиозного и распространенного заболевания вирусного гепатита утят обуславливает разработку современных методов, поэтому исследования Дмитриева К.Ю. выполнены на актуальную тему.

Автор впервые в РФ разработал тест-систему и рекомендовал метод непрямого ИФА для выявления антител в сыворотке крови больных, переболевших, вакцинированных утят, который по специфичности результатов не уступает РН, а его новизна и эффективность подтверждена патентом РФ.

Автор убедительно, доступно излагает результаты собственных исследований: получения вирусодержащего материала, инактивирования возбудителя, получение очищенного антигена, получения специфических сывороток к вирусу на утятках с определением титра, получения фракции Ig G, получение антивидовой сыворотки на кроликах, иммунопeroxидазного коньюгата.

Большая экспериментальная работа проведена по определению оптимальных концентраций и условий взаимодействия компонентов в ИФА. С целью снижения неспецифической адсорбции автор экспериментально подобрал промывочный буфер. Установил параметры тестирования утят на вирусный гепатит типа 1, а активность сывороток крови утят в разработанной тест-системе сравнивал с показателями в РН с определением коэффициента корреляции, что подтверждало высокую чувствительность и специфичность разработанной автором тест-системы.

. Интересные данные получены автором при изучении динамики формирования антител у вакцинированных утят в лабораторных и производственных условиях на взрослом поголовье.

Хотя испытание иммуноферментной тест-системы проведено на ограниченном количестве материала, полученные данные статистически обработаны, сомнений не вызывают.

Полученные убедительные результаты позволили сделать обоснованные выводы и подтвердить патентом на изобретения «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа I». Автор подготовил два методических положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа I» и «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа», которые применяют для научно-исследовательской работе во ВНИВИП и для проведения мониторинговых исследований в утководческих хозяйствах.

Диссертационная работа Дмитриева Константина Юрьевича выполнена на высоком методическом уровне, характеризуется новизной, имеет научно-практическое значение, подтвержденное патентом и практическими рекомендациями, заслуживает высокой оценки, соответствует требованиям ВАК, а ее автор - присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02.- ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Доцент курса ветеринарной микробиологии  
и вирусологии ФГБОУ ВО «Брянский ГАУ»,  
кандидат ветеринарных наук  
243365 Брянская область, пос. Кокино, ул. Советская, 2-42  
тел 910-232-66-42  
E-mail: ter.1917Nin@yandex.ru



**О Т З Ы В**  
на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича «ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА УТЯТ ТИПА I МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Актуальность темы**

Вирусный гепатит утят типа 1 является, как известно, высоко контагиозной болезнью, способен массово поражать утят до 4-6-недельного возраста и вызывать гибель значительной части поголовья в утководческих хозяйствах промышленного типа. Сложная эпизоотическая ситуация по указанной инфекции нередко может быть обусловлена, наряду с особенностями проявления свойств возбудителя в популяциях и несовершенством схем специфической профилактики, несвоевременной лабораторной диагностикой.

В качестве серологического метода диагностики вирусного гепатита утят типа 1 в нашей стране хорошо зарекомендовала себя, в частности, высоко специфичная и достаточно эффективная реакция нейтрализации (РН). Однако она длительна и трудоемка в постановке и значительно осложняет и затягивает процесс исследования большого количества проб.

Для серологической диагностики многих инфекционных болезней животных и птиц получил признание метод иммуноферментного анализа (ИФА/ELISA). Главными достоинствами ИФА являются высокая чувствительность и специфичность, быстрота постановки и автоматизированный учет результатов реакции, что обеспечивает его максимальную пригодность для массовых серологических исследований. Однако, до настоящего времени в РФ тест-систем ИФА для диагностики вирусного гепатита утят типа 1 не было.

В этой связи диссертация Дмитриева К.Ю., цель которой связана с разработкой иммуноферментной тест-системы для выявления и определения уровня антител к антигену вируса гепатита утят типа 1, не вызывает сомнений в отношении актуальности ни с научных, ни с практических позиций.

**Научная и практическая значимость полученных результатов**

Впервые в РФ разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к антигену ВГУ-1, включая разработку метода концентрирования и очистки вируса гепатита утят типа 1 из аллантоисной вирусодержащей жидкости, схем получения высокоактивных, специфичных и стабильных основных ее компонентов, оптимизацию параметров проведения ИФА. При дальнейших исследованиях, в том числе в сравнении с реакцией нейтрализации, в экспериментальных и производственных условиях была доказана высокая чувствительность и специфичность разработанной иммуноферментной тест-системы. С учетом полученных результатов были разработаны соответствующие методические положения («Диагностика вирусного гепатита утят типа 1», 25.01.2016 г.; «Определение специфических

антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа», 28.08.2018 г.), рекомендованные для использования в специализированных практических ветеринарных лабораториях, а также в НИУ. Получен патент РФ «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» № 2684417, 08.05.2018, RU.

Таким образом, разработанная диссертантом тест-система открывает перспективы для широкого использования ИФА, как экспресс-метода, прежде всего в мониторинговых исследованиях, в том числе при оценке уровня формируемого вакцинного иммунитета.

**Достоверность и обоснованность** сформулированных соискателем основных положений диссертации, ее выводов и практических предложений сомнений не вызывает. Материалы диссертации апробированы в научной печати (включая ведущие рецензируемые журналы), на научных и научно-практических конференциях различного уровня. Основные положения, выводы, и предложения, представленные в диссертации, полностью соответствуют цели и задачам работы.

### Заключение

Диссертация Дмитриева К.Ю. на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа» представляет собой самостоятельную законченную научно-квалификационную работу, содержащую результаты, имеющие большое научное и практическое значение.

Актуальность, достаточный объем проведенных исследований, объективность, современный методический уровень, научная и практическая значимость полученных результатов свидетельствуют о соответствии работы требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Дмитриев Константин Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и имmunологией.

Профессор кафедры эпизоотологии и  
микробиологии факультета ветеринарной  
медицины Новосибирского государственного  
аграрного университета, доктор  
ветеринарных наук

Алеся Сергеевна Димова

Почтовый адрес: 630039, г. Новосибирск,  
ул. Никитина, 155(новый корпус)  
Новосибирский госагроуниверситет,  
факультет ветеринарной медицины,  
кафедра эпизоотологии и микробиологии  
Тел. 8(383)267-26-72  
e-mail: mikrobiologii@mail.ru

Подпись А.С. Димовой заверяю:



## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, по теме: «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа»

Рассматриваемая тема диссертационных исследований является актуальной, т.к. в настоящее время вирусный гепатит утят регистрируют во всех регионах, где занимаются разведением уток. Наибольшее число случаев возникновения болезни обусловлено гепатовирусом уток. Большой экономический ущерб вирусный гепатит утят типа 1 наносит промышленным утководческим хозяйствам вследствие массовой гибели утят 1-30 – суточного возраста и падения продуктивности уток. Смертность утят может достигать 30-95%. В результате отставания в росте и развитии у переболевших утят снижаются показатели мясной продуктивности. Ущерб от ВГУ-1 также включает затраты на проведение ветеринарно-санитарных и противоэпизоотических мероприятий при ликвидации болезни. Экономические потери возрастают, когда болезнь приобретает стационарный характер. В связи с вышеизложенным изыскания в данной области являются наиболее актуальными и имеют практическую значимость работы.

Диссидентом К.Ю. Дмитриевым был проведен анализ научной литературы и поисковые исследования. При проведении научно-исследовательской работы использовались вирусологические, микробиологические, биохимические, физико-химические, серологические и статистические методы исследований.

Научная новизна диссертационной работы заключается в проведении сравнительных исследований по определению специфических антител в сыворотке крови в ИФА и РН. Установлена высокая корреляция их значений ( $r = -1,0$ ).

Соискателем ученой степени кандидата ветеринарных наук К.Ю. Дмитриевым по теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 2-х публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, что соответствует п. 13 Положению о присуждении ученых степеней.

Структура написания диссертации и автореферата соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации». Работа выполнена К.Ю. Дмитриевым изложена на 106 страницах компьютерного текста, содержит 14 таблиц, 6 рисунков и 3 формулы.

Автором также самостоятельно проанализировано 151 источник литературы из которых 82 – принадлежат зарубежным авторам.

В целом считаем, что диссертационная работа Дмитриева Константина Юрьевича на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа» соответствует всем предъявляемым требованиям ВАК Российской Федерации, а ее автор – достоин присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринария микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Заместитель директора  
Республиканского дочернего  
унитарного предприятия  
«Опытная научная  
станиця по птицеводству»,  
кандидат сельскохозяйственных наук

 Александр Иванович Киселев

Республика Беларусь,  
223036, Минская область,  
г. Заславль, ул. Юбилейная, 2а  
Тел. +375 17 517 88 44  
E. mail: [onsptitsa@tut.by](mailto:onsptitsa@tut.by)

Подпись удостоверяю:  
Ученый секретарь  
РДУП «ОНСП»,  
кандидат биологических наук



 Людмила Дмитриевна Рак



*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение*  
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт  
биологической промышленности»

## О Т З Ы В

на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа», представленной на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности: 06.02.02- ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Длительная перsistенция вируса гепатита утят типа 1 в организме переболевшей птицы, его генетическая вариабельность, а также течение болезни часто в ассоциации с вирусной и бактериальной инфекциями, требует своевременной диагностики с применением современных методов, в частности метода иммуноферментного анализа. В этой связи, тема диссертационной работы, выбранная автором, несомненно актуальна и имеет большое научное и практическое значение.

Автором в результате проведенных исследований разработан метод получения высокоочищенного вируса гепатита утят типа 1 штамма «ЗМ-УНИП» из аллантоисной жидкости с чистотой 98-99%. Получен антивидовой анти-IgG утки пероксидазный коньюгат и отработаны условия постановки тест-системы непрямого варианта ИФА. С помощью разработанной тест-системы ИФА изучена динамика формирования поствакцинального иммунитета и установлено, что специфические антитела выявляются на 7 день в титре  $592 \pm 36$  и достигали максимума на 30 сутки в титре  $2504 \pm 73$ . Высокая корреляция титров ( $r=-1,0$ ) специфических антител, выявленных методами ИФА и РН, позволила сделать вывод о необходимости внедрения в практику разработанной автором тест-системы, что будет способствовать повышению эффективности диагностики и

обеспечению эпизоотического благополучия в хозяйствах России по вирусному гепатиту утят типа1. Несомненным достоинством диссертационной работы Дмитриева К.Ю. является исследования по определению титра специфических антител по одному разведению, что позволяет исследовать большое количество сывороток одновременно. В работе представлен большой объем экспериментального материала, показан высокий современный методический уровень проведенных исследований. Научная новизна отражена в 9 научных работах, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК. Работа завершается *6 выводами*, которые логически вытекают из результатов проведенных исследований, разработаны методические положения и получен Патент РФ на способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1. Замечаний по материалам, изложенным в автореферате Дмитриева К.Ю.нет.

Диссертационная работа Дмитриева К.Ю. является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, по актуальности, теоретической и практической значимости полученных результатов, полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, заслуживает присуждения учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02-ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и имmunологией.

Зав. отделом иммунологии  
ФГБНУ ВНИТИБП,  
доктор биологических наук, профессор



Клюкина Валентина Ивановна

Подпись В.И.Клюкиной, заверяю  
Ученый секретарь ФГБНУ ВНИТИБП,  
кандидат сельскохозяйственных наук Маркова Евгения Владимировна

141142 Московская обл., Щелковский р-он, п/о Кашинцево, п.Биокомбината  
ФГБНУ ВНИТИБП E-mail: [vnitibp@mail.ru](mailto:vnitibp@mail.ru)

1 февраля 2021 г.

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича по теме: «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и имmunологией

Диссертация Константина Юрьевича Дмитриева на тему: «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа» на соискание ученой степени кандидата наук соответствует специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией и отрасли наук – ветеринарные науки.

Среди серологических методов для определения уровня антител в пробах сыворотки крови уток широко используют реакцию нейтрализации (РН), которая обладает высокой специфичностью. Однако данная реакция является длительной и методически трудоемкой и не всегда удобна для исследования большого количества проб. В настоящее время для контроля уровня иммунного ответа многие исследователи успешно используют метод иммуноферментного анализа (ИФА). Данный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, и в сочетании с быстрой анализа дает ему неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами. Метод позволяет автоматизировать процессы постановки реакции и одновременно исследовать большое количество проб при компьютерной обработке результатов.

Научная новизна состоит в том, что Дмитриевым К.Ю. отработан метод концентрирования и очистки вируса гепатита утят типа 1 из аллантоисной вируссодержащей жидкости, разработана схема получения высокоактивной специфической и антивидовой сыворотки для ИФА. Получен активный, специфичный и стабильный при хранении в жидком состоянии антивидовой иммунопероксидазный конъюгат, специфичный к IgG уток.

Практическая значимость работы состоит в том, что результаты исследований К.Ю. Дмитриева и разработанная им тест-система позволяют проводить мониторинговые исследования сывороток крови уток из утководческих хозяйств Российской Федерации, определять напряженность поствакцинального иммунитета и проводить ретроспективную диагностику данной болезни, а также использовать ее при проведении научно-исследовательских работы во ВНИВИП.

Основные научные результаты исследований и рекомендации по практическому использованию научной разработки конкретны, объективны и полностью вытекают из содержания диссертации. Работа прошла достаточную апробацию. По материалам работы над диссертацией получен патент «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят

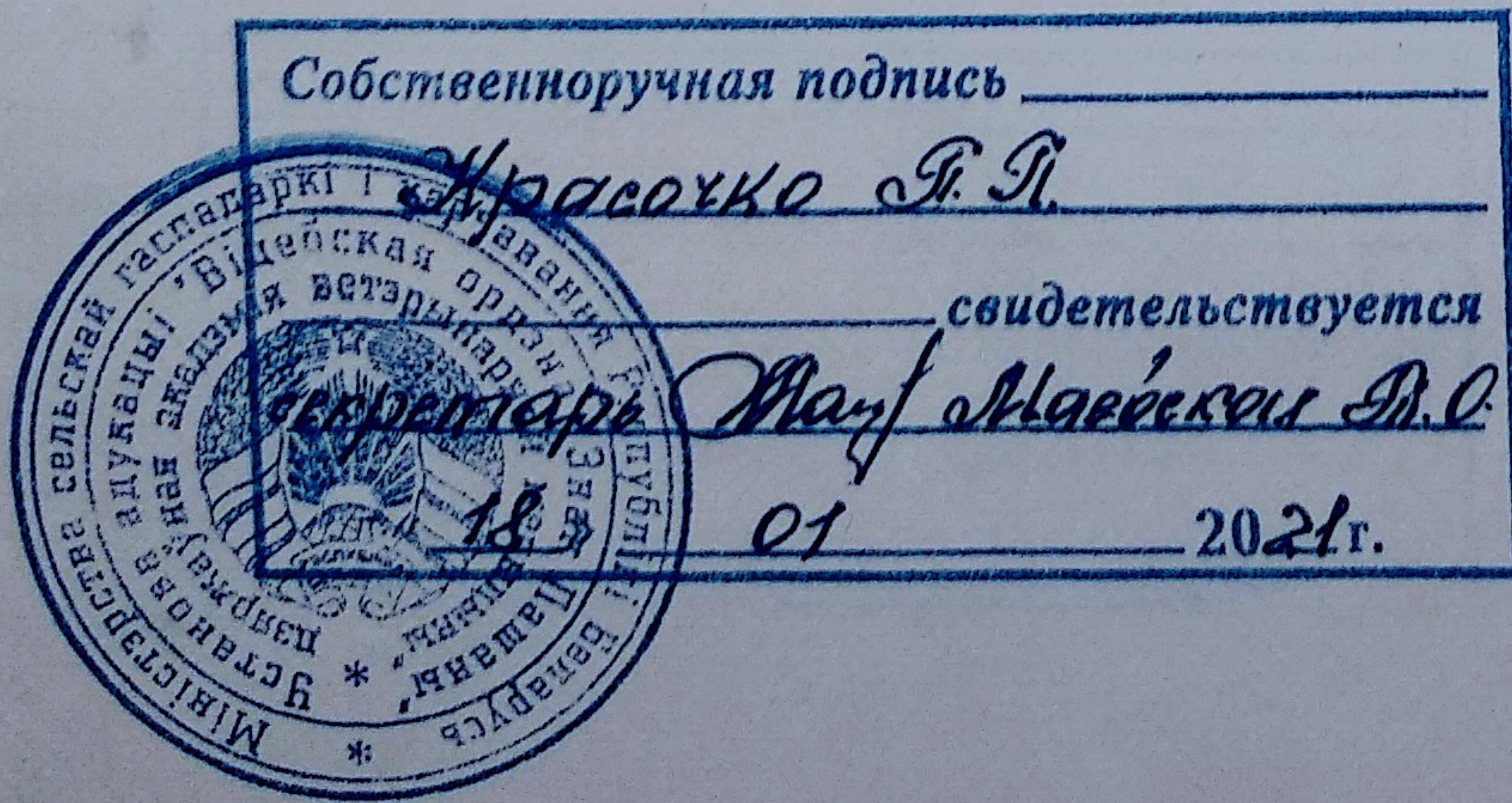
типа 1» № 2684417, 08.05.2018, RU; утверждены Методические положения «Диагностика вирусного гепатита утят типа 1» и «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа»; опубликовано 9 статей, из них 2 по требованиям ВАК РФ.

Считаю, что по методическому уровню проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Константин Юрьевич Дмитриев заслуживает присуждения искомой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и имmunологией.

Заведующий отраслевой лабораторией  
ветеринарной биотехнологии и заразных  
болезней животных УО «Витебская ордена  
«Знак Почета» государственная академия  
ветеринарной медицины», доктор  
биологических наук, кандидат ветеринарных  
наук, доцент

Павел Петрович Красочко

Республика Беларусь,  
210026, г. Витебск,  
ул. 1-я Доватора, 7 / 11  
Телефон +375 33 613-14-15  
E. mail: 7696695@gmail.com



## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа», представленную к защите в диссертационный совет Д 220.038.07 на базе при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13, корпус факультета ветеринарной медицины на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

В условиях постоянно развивающегося промышленного утководства и растущего числа частных подворий на территории Российской Федерации, особого внимания заслуживают вопросы диагностики и профилактики инфекционных болезней, прежде всего особо опасных. Примером такой инфекции служит вирусный гепатит утят типа 1.

Вирусный гепатит утят типа 1 (ВГУ-1) – остропротекающая, высоко контагиозная болезнь утят до 6 – недельного возраста, характеризующаяся преимущественным поражением печени и высокой смертностью, способной достигать 95% утят.

Возникновению эпизоотий данной инфекции в утководческих хозяйствах и промышленных комплексах, зачастую, служит скученное содержание разновозрастных групп птицы на ограниченной территории и постоянный приток новых партий суточного молодняка. Ассоциированное течение данной болезни с заболеваниями вирусной и бактериальной природы значительно осложняет своевременную диагностику и быстрое купирование инфекции.

Поэтому разработка современного и эффективного метода серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 имеет как практическое, так и научное значение для данной отрасли.

В период активного развития промышленного утководства, растет и необходимость в качественных и современных методах и средствах диагностики, в случае возникновения данной инфекции. В связи с этим разработка иммуноферментной тест-системе для диагностики вирусного гепатита утят типа 1 является актуальной проблемой, что наглядно показано в диссертационной работе.

Исследования, проведенные Дмитриевым К.Ю., и полученные им экспериментальные данные свидетельствуют о большом объеме проделанной работы, имеют практическую и научную значимость. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных методов исследований.

Данные получены в результате проведения контролируемых лабораторных опытов, статистически обработаны, что подтверждает их достоверность.

Выводы и практические предложения обоснованы и логически вытекают из результатов проведенных исследований. На основе полученных данных разработаны Методические положения «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа».

Так же, в ходе выполнения диссертационной работы Дмитриевым К.Ю., в соавторстве получен патент на изобретение «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» (№ 2684417, 08.05.2018, RU.)

Разработанная иммуноферментная тест-система была апробирована при исследовании проб сыворотки крови уток, полученных из утководческих хозяйств. Таким образом, была

подтверждена диагностическая ценность разработанной тест-системы для проведения ретроспективной диагностики вирусного гепатита утят типа 1 и контроля поствакцинального иммунитета.

В процессе ознакомления с авторефератом возникли следующие вопросы:

1. Каким методом получали очищенный антиген вируса гепатита утят типа 1?
2. Почему не использовали реакцию диффузационной преципитации (РДП) для сравнительного анализа с разработанной иммуноферментной тест-системой?

#### Заключение

Диссертационная работа «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа» является законченной научно-исследовательской работой. По актуальности, новизне исследований и практической значимости полученных результатов она отвечает п.8 «Положения ВАК Минобразования и науки РФ», а ее автор **Дмитриев Константин Юрьевич** заслуживает присвоения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Главный научный сотрудник,  
доктор ветеринарных наук,  
профессор, член корреспондент РАН

Лайшев Касим Анверович

Подпись Лайшева Касима Анверовича  
заверяю:

Специалист по кадрам Северо-Западного Центра междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук»



Медлина Ольга Борисовна

"25" января 2021 года

#### Данные об авторе отзыва:

Лайшев Касим Анверович, доктор ветеринарных наук, профессор, член корреспондент РАН  
Почтовый адрес: 196602, г. Санкт Петербург, Пушкин, ул. Гусарская, д.9, кор. 2, кв. 10  
Моб. тел.: +79117323828

E-mail: Layshev@mail.ru

Наименование организации: Северо-Западный Центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук»

Должность: Главный научный сотрудник

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа», представленную к защите в диссертационный совет Д 220.038.07 на базе при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т.Трубилина, по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13, корпус факультета ветеринарной медицины на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Вирусный гепатит утят типа 1 – острая высоко контагиозная вирусная болезнь утят до 6-недельного возраста, протекающая с преимущественным поражением печени и высокой смертностью. Широкое распространение болезни обусловлено высокой устойчивостью вируса во внешней среде, длительной персистенцией возбудителя в организме переболевшей птицы и его генетической вариабельностью, а также стационарностью. Ввиду ассоциированного течения болезни основой успешной борьбы с инфекцией является лабораторная диагностика.

Среди серологических методов диагностики широко используют реакцию нейтрализации. Однако она длительная, методически трудоёмкая и не всегда удобна для исследования большого количества проб, в отличие от ИФА-анализа, который, обладая специфичностью, высокой чувствительностью в сочетании с быстрой анализом, даёт неоспоримые преимущества перед другими аналитическими методами.

Учитывая очевидную перспективность ИФА, разработка иммуноферментной тест-системы для индикации и определения концентрации антител к антигену вируса гепатита утят типа I крайне необходима.

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что автором впервые в качестве метода серологической диагностики болезни разработана иммуноферментная тест-система. Оптимизированы параметры проведения ИФА по иммуноспецифическим и неспецифическим компонентам тест-системы. Проведены сравнительные исследования по определению специфических антител в сыворотке крови в ИФА и РН. Установлена прямая коррелятивная зависимость их значений.

Диссидентант для выполнения поставленных задач использовал современные вирусологические, микробиологические, биохимические, физико-химические, серологические и статистические методы исследования.

Полученные автором результаты исследования послужили основанием для разработки методических положений «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа I методом иммуноферментного анализа», и получен патент РФ «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа I» № 2684417, 08.05.2018 г.

Положения, выдвинутые в диссертационной работе, научно обоснованы.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что использование разработанной тест-системы позволит эффективно и достоверно определять уровень специфических антител к вирусу гепатита утят типа I в пробах сыворотки крови методом иммуноферментного анализа.

По теме диссертации автором опубликовано 8 научных статей, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

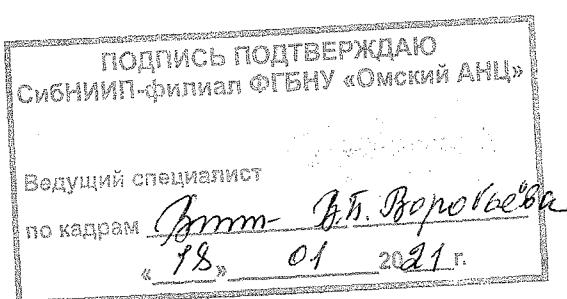
Автореферат диссертации написан грамотно, изложение материала последовательно, все поставленные задачи нашли отражение в разделе «Основное содержание работы».

Диссертационная работа Дмитриева К.Ю. на тему: «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа» является законченной научно-исследовательской работой. По актуальности, новизне исследований и практической значимости полученных результатов она соответствует всем необходимым требованиям, изложенным в п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает присвоения учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности: 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Ведущий научный сотрудник отдела  
ветеринарии сельскохозяйственной птицы  
СибНИИП-филиал ФГБНУ «Омский АНЦ»,  
канд. вет. наук  
18.02.2021 г.

Лыско Светлана Борисовна

Адрес: 644555 Омская область, Омский район, с. Морозовка, ул. 60 лет Победы, д.1., СибНИИП-филиал ФГБНУ «Омский АНЦ»  
Тел/факс 8 (3812) 937-272 / 8 (3812) 937-292, E-mail: sibniip@mail.ru



В диссертационный совет  
Д 220.038.07 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина»

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации ДМИТРИЕВА Константина Юрьевича «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа», представленной к публичной защите на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Вирусный гепатит утят – это острое высококонтагиозное вирусное заболевание, характеризующееся нервными явлениями, некрозом печени и высокой смертностью. Гепатит утят вызывается вирусом, относящимся к семейству *Picornaviridae*, роду *Avihepatovirus*, серотипам I и III. Наибольший экономический ущерб наносит вирус гепатита типа I, который вызывает заболевание с летальностью до 95%. Широкое распространение рассматриваемой нозоформы связано со способностью возбудителя персистировать в восприимчивом организме (Князев В.П., 2013). В системе противоэпизоотических мероприятий ведущее место занимает специфическая профилактика, осуществляемая с использованием вакцин (Никитина Н.В. и др., 2019; Трефилов Б.Б. и др. 2018; 2019). Однако, в борьбе с гепатитом уток немаловажное значение имеет и своевременная диагностика. Используемые в настоящее время методы обнаружения вирусных антигенов (РИФ, РДП), выделение вируса в утиных эмбрионах, культуре клеток, обнаружение и установление титра антител в РН – длительны и трудоемки. Разработанные серологические методы (РНГА, МФА, РДП) (Голубничий В.П., 1984; Демаков Г.П., 1985) не нашли широкого применения. Учитывая вышеизложенное, стремление автора рецензируемой работы разработать иммуноферментную тест-систему для выявления и определения уровня антител к антигену вируса гепатита утят типа I следует признать своевременным и актуальным.

Представленные в автореферате диссертанта материалы свидетельствуют о большом объёме выполненных исследований с использованием современных методов, что позволило адекватно решить поставленные задачи, в том числе получить высокоочищенный антиген вируса гепатита утят, используемый для обнаружения антител к возбудителю; отработать метод концентрирования и очистки ВГУ-1; разработать схему получения специфической и антивидовой сывороток для постановки ИФА; получить стабильный пероксидазный коньюгат для обнаружения IgG и оптимизировать параметры постановки ИФА.

Значительный объём исследованного материала, корректная постановка экспериментального раздела работы, а также адекватная статистическая

обработка и интерпретация данных позволяют судить о материале проведённого исследования как о репрезентативном, а о полученных результатах как о достоверных.

Автором сделаны обоснованные выводы, которые аргументированы большим фактическим материалом и логично вытекают из результатов исследований, однако формулировка шестого вывода у рецензентов вызывает недоумение, т.к. приведённая информация скорее отражает научную новизну и практическую значимость работы, а не существо рассматриваемой проблемы.

Результаты научных изысканий К.Ю. Дмитриева опубликованы в 9 изданиях, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, получен патент РФ на изобретение.

Таким образом, по актуальности, новизне и достоверности полученных результатов, обоснованности сделанных выводов, научной и научно-практической значимости работа «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа I методом непрямого иммуноферментного анализа» отвечает требованиям п. 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней (утверженного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020)), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Рахима Мукташевна Нургалиева – кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры микробиологии и заразных болезней

Мария Викторовна Сычева – доктор биологических наук (06.02.02), доцент, заведующий кафедрой микробиологии и заразных болезней

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный аграрный университет» 460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18.

Тел.: 8(3532)77 52 30

Эл. почта: [ogau@mail.esoo.ru](mailto:ogau@mail.esoo.ru)

Подлинность подписи заведующего кафедрой М.В. Сычевой и доцента Р.М. Нургалиевой заверяется

Ректор ФГБОУ ВО  
Оренбургский ГАУ  
«1» февраля 2021 г.

Алексей Геннадьевич Гончаров



**ОТЗЫВ**  
на автореферат диссертации Дмитриева Константина Юрьевича  
по теме «Тест-система для серологической диагностики вирусного  
гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа»  
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук  
по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Представленная для защиты диссертации К.Ю. Дмитриевым тема «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа» является актуальной. Вирус гепатита утят типа 1 репродуцируется в клеточных культурах, в 12-13-суточных эмбрионах уток, 7-9-суточных эмбрионах кур, а также в эмбрионах перепелок. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Picornaviridae*, роду *Avihepatovirus*. Вирусный гепатит уток типа 1 (DHV-1) имеет и другие названия - инфекционный гепатит уток, вирусный гепатит утят, Duck virus hepatitis, Duck hepatitis type 1. Различают три различных генотипа, называемых – вирус гепатита уток А типа 1, 2 и 3. В большинстве случаев отмечаются сверхострая и острая формы течения болезни. В неблагополучных утководческих хозяйствах острое течение болезни характеризуется непродолжительным инкубационным периодом, который составляет от 1 до 7 суток, реже - до 12-13 суток и очень короткой продолжительностью болезни в пределах 1-3 часов, реже - 4-5 часов.

Научно-исследовательская работа, выполненная К.Ю. Дмитриевым по разработке иммуноферментной тест-системы для выявления антител к антигену ВГУ-1, а также получению активного, специфичного и стабильного при хранении в жидком состоянии антивидового иммунопероксидазного коньюгата, специфичного к IgG уток имеет научную новизну и практическую значимость.

Цель диссертационных исследований – разработка иммуноферментной тест-системы для выявления и определения уровня антител к антигену вируса гепатита утят типа 1.

Соискателем ученой степени был проведен анализ научной литературы и поисковые исследования. При проведении научно-исследовательской работы использовались вирусологические, микробиологические, биохимические, физико-химические, серологические и статистические методы исследований.

Теоретическая и практическая значимость выполненной работы подтверждается разработанными для специалистов Методическими положениями «Диагностика вирусного гепатита утят типа 1» и «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом иммуноферментного анализа», а также патентом РФ «Способ определения специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1» № 2684417, 08.05.2018, RU.

Выводы и предложения производству соответствуют поставленным задачам, звучат убедительно и лаконично.

Основные результаты научных исследований, представленные в диссертации многократно доложены, обсуждены и одобрены на Международных научно-практических конференциях. По материалам диссертации опубликовано 9 научных статей, в том числе 2 в рецензируемых изданиях ВАК РФ.

**Оформленные и представленные диссертация и автореферат соответствуют требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации».**

В заключении отметим, что диссертационная работа Дмитриева Константина Юрьевича на тему «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа» соответствует всем предъявляемым требованиям соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор – заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией.

Заведующий кафедрой зоогигиены, экологии и микробиологии  
учреждения образования «Белорусская государственная орденов Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия»,  
доктор сельскохозяйственных наук, профессор

 Садомов Н.А.

20.01.2021 г.

Республика Беларусь,  
213407, Могилевская область,  
г. Горки, ул. Мичурина, д.5, учебный корпус № 10  
Телефон (+3752233) 7-96-43.

Адрес электронной почты: [kafedrazoogigieny@baa.by](mailto:kafedrazoogigieny@baa.by)





**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Департамент научно-технологической политики и образования  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ  
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)**

---

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11  
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: [vnivi@mail.ru](mailto:vnivi@mail.ru) ИНН – 1660022161, КПП – 166001001

---

### **ОТЗЫВ**

на автореферат диссертационной работы Дмитриева Константина Юрьевича на тему: «Тест-система для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1 методом непрямого иммуноферментного анализа», представленную в диссертационный совет Д 220. 038.07 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и имmunологии.

Вирусный гепатит уток - контагиозная вирусная болезнь главным образом утят до 4-недельного возраста, характеризующаяся преимущественно поражением печени. Регистрируется во многих странах мира с развитым утководством, в том числе и в РФ. Гибель утят от болезни может достигать до 95%. Важным звеном в борьбе с инфекцией в племенных стадах уток является своевременная диагностика. В нашей стране при серологической диагностике гепатита уток широко используется реакция нейтрализации. За рубежом для контроля антигенной активности вакцины против гепатита уток применяется метод ИФА. Основным преимуществом этого метода являются высокая чувствительность, стабильность результатов при серийном выпуске реагентов набора, простота учета реакции, экспрессность. В связи с вышеизложенным, диссертационная работа Дмитриева К.Ю., посвященная разработке тест-системы для серологической диагностики вирусного гепатита уток методом непрямого иммуноферментного анализа, является актуальной для ветеринарной науки и практики.

При выполнении данной работы Дмитриевым К.Ю. на первом этапе отработаны методы получения специфических компонентов тест-системы: вирусного антигена из аллантоисной жидкости, специфической сыворотки крови к вирусу гепатита утят, антивидовой сыворотки на кроликах, а также иммунопероксидазного коньюгата. Затем на основе специфических компонентов впервые в РФ разработана иммуноферментная тест-система для определения специфических антител к вирусу гепатита типа 1. При этом были проведены исследования по определению рабочих концентраций антигена и антивидового коньюгата, времени и температуры иммобилизации антигена, температуры и времени инкубации сыворотки крови. Тест-система апробирована в производственных условиях. При этом показана диагностическая ценность иммуноферментной тест-системы для определения

специфических антител при проведении ретроспективной диагностики и определения поствакцинального иммунитета при вирусном гепатите утят типа 1. На основании результатов исследований разработаны Методические рекомендации «Определение специфических антител к вирусу гепатита утят типа 1 методом ИФА», на способ определения антител к вирусу гепатита утят получен патент РФ.

Работа имеет и практическое значение. Разработанная тест-система рекомендована для использования специалистами ветеринарных лабораторий разного уровня, сотрудниками научно-исследовательских учреждений, а также в учебном процессе высших учебных заведений ветеринарного и биологического профиля.

Научное исследование выполнено соискателем ученой степени самостоятельно, в ходе которого проведен анализ научной литературы по теме диссертации, поставлена цель и определены задачи, освоены современные и классические методики исследований с последующей статистической обработкой полученных результатов, сформулированы основные положения и выводы диссертации. Опубликованные результаты исследований подтверждают значительный вклад докторанта в решение поставленных задач.

Материалы диссертации доложены, обсуждены и получили положительную оценку на 4 научно-практических конференциях разного уровня. По теме диссертации опубликованы 9 научных работ, в том числе 2 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Заключение.** Таким образом, диссертационное исследование К.Ю. Дмитриева, посвященное актуальной теме – разработке тест-системы для серологической диагностики вирусного гепатита утят типа 1, характеризуется новизной, теоретической и практической значимостью, соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук и его автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 06.02.02 – «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией».

Заведующий лабораторией бактериальных патологий животных ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», доктор биологических наук

Геннадий Николаевич  
Спиридовон

08 февраля 2021 г.

420075, г. Казань, Научный городок-2. ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Тел: (843)239-53-37; e-mail: univ@mail.ru

Подпись Г.Н. Спириданова заверяю:  
Ученый секретарь ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИИ»,  
кандидат биологических наук

Ленар Ильгизарович  
Зайнуллин

