

В диссертационный совет 99.0.092.02  
на базе ФГАНУ «Всероссийский  
научно-исследовательский институт  
молочной промышленности»,  
ФГБОУ ВО «Российский  
биотехнологический университет  
(РОСБИОТЕХ)»  
125080, г. Москва, Волоколамское  
шоссе, д. 11, корп. А

## ОТЗЫВ

официального оппонента, д.т.н., руководителя научно-исследовательского испытательного центра (НИИЦ) ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем имени В. М. Горбатова» РАН Натальи Леонидовны Востриковой на диссертационную работу Лазаревой Екатерины Германовны на тему: "Разработка тест-системы для количественного определения провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах", представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 4.3.3.

### Пищевые системы

#### **Актуальность темы диссертационной работы**

Актуальность диссертационной работы Лазаревой Екатерины Германовны, посвященной разработке тест-системы для количественного определения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) в молоке и молочных продуктах, обусловлена несколькими ключевыми факторами. В последние годы наблюдается устойчивый рост распространенности вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации. Это заболевание приводит к значительным экономическим потерям в молочной промышленности и представляет угрозу для здоровья животных. По мере совершенствования аналитических методов все чаще появляются сообщения об обнаружении вируса BLV и антител к нему у людей. Данный факт вызывает серьезные опасения относительно потенциального риска для здоровья людей, употребляющих молочные продукты.

На данный момент отсутствуют отечественные наборы реагентов для детекции провирусной ДНК BLV в молоке и молочных продуктах, прошедших термическую обработку. Существующие методы контроля качества молочной продукции не всегда обеспечивают достаточную чувствительность и специфичность для выявления BLV. Введение современных молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР в реальном времени, позволяет значительно повысить точность и скорость детекции вируса в молочной продукции. Разработка и внедрение отечественных тест-систем для выявления BLV

соответствуют этим требованиям и способствуют повышению конкурентоспособности российской молочной продукции на международном рынке. Таким образом, диссертационная работа Лазаревой Екатерины Германовны направлена на решение актуальной проблемы обеспечения безопасности молочной продукции и защиты здоровья потребителей. Разработка эффективной и доступной тест-системы для детекции провирусной ДНК BLV имеет важное значение как для молочной промышленности, так и для общественного здравоохранения.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Лазаревой Екатериной Германовной проведен детальный анализ отечественного и зарубежного опыта в области диагностики и контроля качества молочной продукции, инфицированной вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Автором изучены современные молекулярно-генетические методы, включая ПЦР в реальном времени, что позволило ей разработать новый методический подход для количественного определения провирусной ДНК BLV в молоке и молочных продуктах.

Обоснованность и достоверность полученных результатов, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений. Экспериментальные исследования были проведены в соответствии с действующими стандартами, оригинальными и утвержденными методиками с применением современных методов молекулярной биологии и биоинформатики. В процессе работы были использованы специфические олигонуклеотидные праймеры, разработанные на основе биоинформатического анализа, что обеспечило высокую специфичность и чувствительность детекции вируса.

Результаты экспериментов продемонстрировали высокую воспроизводимость и устойчивость тест-системы к различным условиям анализа, включая многократное замораживание-оттаивание.

Таким образом, исследования выполнены на высоком научно-методическом уровне и имеют значительное научное и практическое значение, что подтверждает высокую степень обоснованности всех научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертации.

### **Научная новизна диссертационной работы**

К результатам работы, имеющим научную новизну, относятся:

впервые разработана отечественная методика для количественного определения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота в молоке и молочных продуктах с использованием ПЦР в реальном времени;

созданы специфические олигонуклеотидные праймеры для амплификации фрагментов провирусной ДНК BLV, что обеспечивает высокую специфичность и чувствительность детекции;

оптимизированы методы выделения ДНК из молока и молочных продуктов, что позволяет получать высококачественные образцы ДНК, пригодные для анализа;

проведена метрологическая оценка разработанной тест-системы, включая параметры сходимости и воспроизводимости результатов, а также устойчивости к многократному замораживанию-оттаиванию;

экспериментально подтверждена эффективность использования стандартных положительных образцов на основе генно-инженерного продукта и нативной ДНК больных лейкозом КРС животных, что составляет 100% при уклоне графика -3,345;

установлено, что тест-система показывает высокую устойчивость к замораживанию-оттаиванию, с коэффициентом вариации  $C_v$  не превышающим 4,95% между 1 и 10 циклами; разработан прототип тест-системы, включающий все необходимые для проведения анализа реагенты и стандартные образцы.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Совокупность научных положений, сформулированных и обоснованных в диссертации Лазаревой Екатерины Германовны, представляет собой теоретическую и практическую основу для разработки методов контроля качества и безопасности молока и молочных продуктов. В работе предложен новый подход к выявлению и количественной оценке провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Разработанные методики выделения и анализа ДНК из молока и молочных продуктов, прошедших термическую обработку, позволяют более точно и эффективно выявлять присутствие в них провирусной ДНК BLV, что имеет важное значение для обеспечения безопасности потребителей. Практическая значимость работы заключается в создании тест-системы для количественного определения провирусной ДНК BLV, которая может быть широко использована в молочной промышленности для контроля качества продукции. Разработанная тест-система демонстрирует высокую эффективность и надежность, что подтверждается результатами метрологических испытаний. Внедрение данной системы позволит значительно снизить риски распространения вируса лейкоза крупного рогатого скота через молочные продукты, обеспечивая тем самым их безопасность.

Разработанные методика и тест-система могут быть использованы в лабораториях контроля качества на молокоперерабатывающих предприятиях и научно-

исследовательских организациях, что способствует улучшению контроля качества молочной продукции, повышению ее безопасности и защите здоровья потребителей.

Кроме того, значимость работы подтверждается разработкой Стандарта организации (СТО), который регламентирует процедуры выделения и количественного определения провирусной ДНК BLV в молоке и молочных продуктах. Введение стандарта позволит унифицировать процессы контроля качества на предприятиях молочной промышленности, обеспечивая высокую точность и воспроизводимость результатов анализа.

### **Оценка содержания диссертационной работы и автореферата**

Диссертационная работа Лазаревой Екатерины Германовны " Разработка тест-системы для количественного определения провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах " изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы и приложений. В работе содержится 36 рисунков, 18 таблиц, список литературы включает 153 литературных источника, из которых 79 на иностранных языках.

Введение содержит обоснование актуальности темы исследования, цель и задачи работы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, методы исследования, а также положения, выносимые на защиту.

**Глава 1** посвящена обзору литературы по теме диссертации. В ней рассматриваются основные аспекты эпизоотологии лейкоза крупного рогатого скота, структура и функционирование вируса BLV, современные методы диагностики и контроля BLV в молочной продукции. Автор обосновывает выбор объекта и методов исследования.

**Глава 2** описывает материалы и методы исследования. Приведены характеристики использованных образцов молока и молочных продуктов, методы выделения и очистки ДНК, а также методики проведения ПЦР в реальном времени. Детально изложены процедуры разработки и валидации праймеров для амплификации провирусной ДНК BLV.

**Глава 3** представляет результаты собственных исследований автора. В ней рассматриваются результаты оптимизации методов выделения ДНК, анализ метрологических характеристик разработанной тест-системы, включая сходимость и воспроизводимость результатов. Приведены данные экспериментальной проверки тест-системы на различных типах молочной продукции, а также обсуждаются результаты и перспективы практического применения разработанной методики.

**Заключение** содержит основные выводы по результатам исследования, рекомендации по использованию разработанной тест-системы в молочной промышленности и направления дальнейших исследований.

### **Полнота опубликования основных положений и результатов диссертации**

Результаты исследований диссертационной работы Лазаревой Е.Г. опубликованы в 15 печатных работах, в том числе: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе Web of Science, 3 статьи в журналах РИНЦ и 7 публикаций в сборниках трудов конференций.

Результаты и основные положения диссертации апробированы и неоднократно докладывались на международных и всероссийских научных конференциях.

### **Замечания по диссертационной работе и автореферату:**

1. Согласно задаче № 3, в части « ...и разработать дизайн олигонуклеотидных праймеров для проведения количественного анализа провирусной ДНК» – не совсем понятно, как разрабатывался дизайн праймеров, т.к. согласно информации представленной на стр.66 диссертации указано, что осуществлен их подбор в базе данных GeneBank с использованием алгоритма BLAST. Диссертантом на мой взгляд выбран не удачный термин, т.к. это скорее биоинформационное конструирование, а разработка праймеров включает в себя специфику выравнивания для генетически высоковариабельных ДНК-мишеней

2. Почему было сконструировано именно 3 пары праймеров, а не одна или пять к примеру?

3. Не совсем корректно представлена информация на стр.67 диссертации с указанием проверки эффективности с использованием разных праймеров, отсутствует отсыл к рисункам 3.11-3.13.

4. Требуется пояснение задачи №4, что подразумевается под эффективностью праймера применительно к продукту? т.к. данный термин применим к ПЦР.

5. Не совсем понятно: на схеме рисунок 2.1 отсутствует информация по «Исследовать существующие альтернативные методы выделения ДНК из сырого молока и продуктов его переработки» но присутствует блок теоретический, как это соотносится? Были ли проведены апробации и исследования или просто дана оценка по литературным источникам? Так же не совсем понятно (стр.50-51) проведена сравнительная оценка тест-систем на выделение ДНК (по инструкции набора) или под эти тест-системы разработаны и отработаны методы выделения непосредственно диссертантом?

6. Чем обусловлен выбор именно этих двух наборов для рассмотрения? Концентрация не является ключевым показателем ДНК т.к. она может быть выше, но по качеству (чистоте) быть хуже. Оценивалось ли качество выделенной концентрации ДНК, к примеру по методу спектральной оценки на разных длинах волн?

7. На рисунке 3.3 диссертации отсутствует явная фрагментация и нет его описания с указанным отличием, требуется пояснение.

8. В целом по диссертации, не совсем очевидно из представленного обзора литературы, целесообразность контроля в продуктах лейкоза? И чем обоснована необходимость определения количества ДНК вируса, а не просто его присутствия?

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней**

Диссертационная работа Лазаревой Екатерины Германовны на тему «Разработка тест-системы для количественного определения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) в молоке и молочных продуктах» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи для молочной промышленности, связанной с обеспечением качества и безопасности молочной продукции.

Представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата технических наук, а ее автор, Лазарева Екатерина Германовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 4.3.3 «Пищевые системы».

Официальный оппонент:  
Доктор технических наук  
по специальностям 05.18.04, 05.18.07,  
руководитель научно-исследовательского  
испытательного центра (НИИЦ)  
ФГБНУ  
«ФНЦ пищевых систем имени  
В.М. Горбатова» РАН

Наталья Леонидовна Вострикова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН (ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН)  
Россия, 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26,  
Телефон: +7 (495) 676-95-11 Факс: +7 (495) 676-9551  
e-mail: [n.vostrikova@fncps.ru](mailto:n.vostrikova@fncps.ru)

Я, Наталья Леонидовна Вострикова, даю согласие на включение моих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Лазаревой Екатерины Германовны, и их дальнейшую обработку.

**ПОДПИСЬ РУКИ  
ЗАВЕРЯЮ**

Ведущий специалист  
по управлению персоналом  
Кудряшова У.А.



19.11.2024