



Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный центр охраны здоровья животных»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)



Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру. Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.  
Референтный центр ФАО по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

« 02 » ноября 2018 г.

№ 01-04 / 13069

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Власовой Натальи Никифоровны на диссертационную работу Стаффорд Виктории Васильевны по теме «Патологоанатомическая характеристика и иммуногистохимическая диагностика вирусного репродуктивного и респираторного синдрома свиней», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**Актуальность темы.** Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC) является одним из наиболее распространенных и экономически значимых возбудителей болезней свиней. На сегодняшний день в России сложилась неоднозначная ситуация по данному заболеванию, искоренение которого требует четкого выявления и регистрации всех заболевших и контактировавших с больными животными. Для предупреждения распространения PPCC необходимо применение дифференциального подхода в зависимости от статуса свиноводческих хозяйств: в свободные от PPCC предприятия поставляются животные только из благополучных хозяйств, а в ранее неблагополучные хозяйства - только иммунизированные свиньи.

Одним из основных факторов диссеминации вируса является его бессимптомная циркуляция на взрослом поголовье, поэтому по ветеринарно-санитарным правилам предупреждение распространения вируса PPCC внутри стада и вынос его за пределы свинокомплексов достигается наложением ограничительных мер на хозяйства, несвободные от PPCC.

600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец

тел.: (4922) 26-06-14, тел./факс: (4922) 26-38-77

E-mail: mail@arriah.ru

Вх. № 103

07 ноября 2018 г.

Вирус РРСС имеет однонитевой РНК - геном и считается одним из самых вариабельных и быстро мутирующих вирусов, что обуславливает существование множества вариантов возбудителя, обладающих выраженной гетерогенностью состава популяции и различающихся по своим генетическим характеристикам и биологическим свойствам. Все изоляты и штаммы вируса РРСС подразделяются на 2 генотипа: европейский и американский. Причем, европейский генотип имеет 3 подгруппы, а американский - 9.

Таким образом, разработка диагностических методов, позволяющих идентифицировать этиологический агент РРСС обоих генотипов в патологическом материале и устанавливать причину, приведшую животных к гибели при смешанной инфекции, является наиважнейшей задачей для искоренения РРСС.

В связи с этим, главная цель исследований Стаффорд В.В. посвящена актуальной проблеме – изучению патоморфологических и иммуногистохимических особенностей проявления РРСС при естественной и экспериментальной инфекции. А разработка иммуногистохимического метода выявления вируса РРСС в тканях и органах инфицированных животных является второй значимой частью ее диссертационной работы.

Для достижения поставленной цели диссертанту было необходимо решить несколько задач: от выполнения экспериментального заражения свиней вирусом РРСС референтного штамма «Lelystad» и вирулентного штамма «Западносибирский 13», изучения патологоанатомических и гистологических изменений в органах свиней и обнаружения вируса у экспериментальных животных и свиней из инфицированных РРСС хозяйств до разработки тест-системы иммуногистохимического выявления антигена нуклеокапсидного белка на основе моноклональных антител отечественного производства.

В соответствии с поставленными задачами диссертант проработал отечественную и зарубежную литературу по избранной теме и смежным вопросам, в течение работы провел исследование с использованием традиционных и современных методик, осуществил детальный анализ результатов экспериментов, соответствующим образом их обобщил и оформил в виде представленной диссертации.

**Научная новизна исследований** заключается в том, что Стаффорд В.В. изучила биологические свойства вируса РРСС вирулентного штамма «Западносибирский 13» при экспериментальном заражении. Автором разработан метод

иммуногистохимической (ИГХ) диагностики РРСС, на основе отечественных моноклональных антител 4h7h9. Использование указанных моноклональных антител к капсидному белку вируса РРСС позволяет выявить антиген возбудителя болезни в органах и тканях свиней при заражении как европейским, так и американским типами вируса. Автором установлены и описаны гистоморфологические изменения в легких, лимфатических узлах и паренхиматозных органах при экспериментальном заражении и естественном инфицировании РРСС. Прослежена динамика диссеминации возбудителя в организме свиней.

Кроме того, показано, что ИГХ анализ может служить и, как для подтверждения данных патолого-морфологических исследований и использоваться, как альтернативный метод диагностики РРСС.

Разработка и применение ИГХ метода для РРСС позволил автору получить данные патоморфологических исследований органов свиней, содержащихся в лабораторных условиях и в свиноводческих хозяйствах.

Диссертантом получен патент на изобретение «Способ диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней непрямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител» № 2645114. Разработанный автором метод позиционируется, как одно из важных звеньев комплексной диагностики, определяющей этиологическую роль вируса, что позволяет применять эффективную стратегию эрадикации и специфической профилактики РРСС.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основе анализа образцов, полученных из свиноводческих хозяйств, неблагополучных по РРСС и использования разработанной тест-системы диссертантом достоверно определена этиология заболевания, что очень важно при наличии смешанных инфекций на свинофермах. Разработаны методические рекомендации по ИГХ диагностике РРСС свиней, которые утверждены на Секции «Зоотехния и Ветеринария» отделения сельскохозяйственных наук РАН 01 декабря 2016г. «Регламент проведения иммуногистохимической диагностики РРСС» апробирован для диагностических исследований в хозяйствах, неблагополучных по респираторным и репродуктивным заболеваниям свиней.

**Практическая значимость и реализация результатов исследований** состоит в том, что полученные результаты исследований позволяют расширить

комплексный анализ при диагностике РРСС и при подозрении присутствия иных возбудителей респираторных и репродуктивных инфекций, а тест-систему внедрить в практику для обязательного определения статуса поголовья.

**Обоснованность и достоверность** основных положений и заключительных выводов, сформулированных в диссертационной работе Стаффорд В.В., подтверждается объемом исследований, проведенных на значительном экспериментальном материале. На разработанный метод автором получен патент, что говорит о достоверности полученных результатов.

#### **Предложения по использованию результатов исследований.**

На основании проведенных автором исследований для внедрения в ветеринарную практику предложена новая тест-система выявления вируса РРСС, которая может быть использована при проведении ИГХ анализа по детекции нуклеокапсидного белка вируса на основе применения моноклональных антител отечественного производства.

Материалы диссертации применимы в научно-исследовательских лабораториях при дальнейшем изучении особенностей тропизма вируса и при разработке новейших методов диагностики РРСС, таких, как гибридизация *in-situ* или *pen-side* тест.

**Содержание работы.** Представленная диссертационная работа построена по традиционному плану: изложена на 120 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований: материалов и методов проводимых исследований, экспериментальной части, заключения, выводов и приложений. В заключительной части диссертации представлен библиографический список использованной литературы, состоящий из 159 источников, из которых 37 – отечественные, а 122 - зарубежные. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 37 рисунками.

В приложении представлена копия титульного листа патента, подтверждающая достоверность результатов работы, её научную новизну и практическую значимость.

В разделе **Введение** диссертант обосновывает актуальность выбранной темы исследования, отмечает степень ее разработанности, определяет цели и задачи исследований, формулирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость результатов исследований, излагает методологию и методы исследования, выдвигает основные положения диссертационной работы,

выносимые на защиту, подтверждает личный вклад, доказывает степень достоверности результатов, сообщает необходимые сведения о публичных презентациях по теме работы, указывает объём и структуру диссертации.

Следует отметить, что работа выполнялась в рамках государственного задания №0578-2015-0001, а материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБНУ ВИЭВ и представлены научной общественности на Молодежных научных конференциях (Россия, г.Ставрополь, 2016) и на международных научных симпозиумах (Босния и Герцеговина, г.Ягорина, 2016; США, г.Чикаго, 2016; Россия, г.Уфа, 2017).

**Обзор литературы** составлен объективно, на основе результатов, приведенных в отечественной и зарубежной литературе, Стаффорд В.В. анализировала литературные данные, характеризующие современное состояние вопроса.

В главе 1.1 «Роль репродуктивного и респираторного синдрома свиней в инфекционной патологии свиней» приведен анализ ситуации по РРСС в России и в мире, указаны основные возрастные группы восприимчивых животных, а также подробно рассмотрен вопрос о сопутствующих возбудителях при сочетанных с РРСС инфекциях.

В главе 1.2 «Характеристика возбудителя репродуктивного и респираторного синдрома свиней» подробно описана история открытия возбудителя РРСС, а также структура его вириона, отмечены особенности variability генома вируса и его филогенетическая классификация.

Особо значимым автор посчитал привести сведения о генетической изменчивости вируса, т.к. это один из аспектов, обуславливающих низкую эффективность мер специфической профилактики при данной болезни.

Затем диссертант приводит сведения о механизме репродукции вируса РРСС, отдельно уделив внимание особенностям механизма распространения вируса РРСС в организме свиней.

В главах 1.3 - 1.5 диссертант подробно описывает клинические и патологоанатомические признаки репродуктивного и респираторного синдрома свиней.

В главе 1.6 автор рассматривает механизм формирования иммунного ответа, указывая основные пути распространения вируса в организме свиней и отмечая,

что рецепторы вируса РРСС обладают аффинностью к CD-169 и CD-163 рецепторам макрофагов. Кроме того, детально разобрана роль отдельных белков вируса РРСС в развитии патологического процесса.

Различные лабораторные методы диагностики РРСС описаны Стаффорд В.В. в главе 1.7, где приведены как классические методы, так новейшие разработки в данной области. Отдельно обсуждается вопрос о дифференциальной диагностике репродуктивного и респираторного синдрома свиней.

В главе 1.8 автор акцентирует внимание на мерах борьбы с распространением репродуктивного и респираторного синдрома свиней, останавливаясь на методах иммунопрофилактики болезни и ветеринарно-санитарных мероприятиях при РРСС.

В заключении по обзору литературы автор подводит итоги анализа литературных данных и обосновывает необходимость проведения настоящей работы по разработке тест-системы выявления вируса РРСС на основе метода иммуногистохимической детекции нуклеокапсидного белка вируса с применением моноклональных антител отечественного производства.

Раздел 2 **Собственные исследования** начинается с главы 2.1 **Материалы и методы**, в которой, представлены в качестве источника вируса РРСС референтный штамм «Lelystad» и вирулентный штамм «Западносибирский 13», детально описаны условия постановки опытов, проведения реакции и даны подробные характеристики оборудования, а также питательных сред, растворов, реактивов; четко описаны методы, используемые автором для проведения научно-исследовательской работы по теме диссертации.

В разделе 3 **Результаты собственных исследований** в главе 3.1 «Экспериментальное заражение свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома свиней» автором описаны постановка опыта и анализ клинических признаков при экспериментальном заражении свиней.

Стаффорд В.В. отмечает, что в результате заражения поросят вирулентным вирусом штамма «Западносибирский 13» по сравнению с животными, инфицированными вирусом референтного штамма «Lelystad», клинические проявления были более выраженные и характеризовались гипертермией до 42°С, прогрессирующей апатией уже через 24 часа после заражения. Гибель с признаками асфиксии у 50% животных наступила в течение первых суток. Остальные животные этой группы пали в последующие 5-6 суток.

Сравнительный анализ проявления клинических признаков при естественном инфицировании свиней вирусом РРСС позволил автору установить зависимость развития патологического процесса от длительности течения болезни, иммунного статуса животных и их возраста.

Данные из свиноводческих хозяйств, свидетельствовали, что основными признаками РРСС являлись высокая смертность поросят раннего возраста и аборт у свиноматок во второй половине супоросности, а также рождение слабых, нежизнеспособных поросят.

Результаты исследований на РРСС образцов органов и тканей, полученных от естественно инфицированных свиней, позволили автору отметить сходство патологоанатомических и патоморфологических изменений «с экспериментальными данными и в основном отражали хроническое течение болезни».

Сравнение результатов лабораторно-диагностических исследований образцов из экспериментального материала и от естественно зараженных животных, представленное в главах 3.5.2 и 3.5.3, подтвердило высокую специфичность и чувствительность методов иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), причем, пробы положительные в ИФА были таковыми и в ПЦР.

При анализе результатов ИГХ автор отметил целесообразность для применения диагностической ИГХ тест-системы с целью дифференциальной диагностики респираторных болезней у животных, содержащихся в свиноводческих хозяйствах.

Кроме того, диссертант провел сравнительный анализ ИГХ исследований гистологических препаратов органов с докраской и без докраски ядер гематоксилином Майера.

В разделе **Обсуждение** Стаффорд В.В. приводит краткое описание полученных результатов. К сожалению, в данной работе диссертант не сравнивает собственные результаты по применению ИГХ тест-системы с результатами тест-систем других авторов, опубликованными в научных источниках. Подобный анализ позволил бы исследователям более точно оценить достоинства разработанной ИГХ тест-системы и выявить разницу в диагностических характеристиках уже используемых тест-систем.

В **Заключении** автор кратко излагает мотивацию исследований и основные результаты проделанной работы.

Выводы и практические предложения диссертации вытекают из результатов проведенных исследований и находятся в соответствии с изложенным фактическим материалом.

Материалы, приведенные в диссертации, подтверждают, что автор справился с поставленными задачами.

В автореферате и тринадцати опубликованных статьях отражено основное содержание работы.

Однако, в процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие замечания:

1. Основным недостатком работы Стаффорд В.В. является отсутствие сравнительного анализа собственных исследований и разработок с аналогичными экспериментальными данными, описанными как в отечественной, так и в зарубежной литературе.
2. В диссертации отсутствуют данные о чувствительности разработанного метода, так, в таблице 8, приведены только результаты выявления антигена вируса РРСС в ИГХ при исследовании легких и лимфатических узлов у естественно инфицированных свиней, но не приводятся результаты исследований этих проб в ПЦР.
3. Вывод 5 сделан некорректно, поскольку не проведен анализ на наличие/отсутствие других болезнетворных агентов, а автор подтверждает высокую инцидентность сочетанных с РРСС инфекций.

Кроме того, в тексте встречаются неудачные выражения и орфографические ошибки.

Однако, перечисленные выше замечания не снижают положительной оценки настоящей работы.

В заключении хотелось бы отметить, что работа Стаффорд В.В. – это самостоятельный научно-исследовательский труд, основанный на экспериментальном материале, выполненный на хорошем методическом уровне с использованием современных методов, имеющий высокий уровень достоверности и отражающий основные аспекты изучаемой проблемы.

Таким образом, по актуальности проблемы, методическому уровню, научно-практической значимости полученных результатов и по вкладу в практику работа



Стаффорд Виктории Васильевны отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология).

Официальный оппонент  
главный научный сотрудник референтной  
лаборатории по африканской чуме свиней  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения «Федеральный центр охраны  
здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)  
(600901, г. Владимир, мкр. Юрьеvec,  
тел. (4922) 26-06-14, доб. 23-22, mail@arriah.ru)  
доктор биологических наук

Наталья Никифоровна Власова

Подпись Н.Н. Власовой удостоверяю:  
Учёный секретарь Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
«Федеральный центр охраны  
здоровья животных»  
доктор ветеринарных наук, профессор



Владимир Сергеевич Русалеев