



Россельхознадзор

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

микрорайон Юрьевец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Груздева Константина Николаевича на диссертационную работу Стрельцовой Яны Борисовны «Патогенетическая характеристика и идентификация иммунокомпетентных клеток в органах свиней при спонтанном инфицировании цирковирусом второго типа», представленную к защите в диссертационный совет 24.1.249.01 при ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской Академии Наук» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных».

Актуальность темы. В конце XX века рядом ученых в Северной Америке и Европе из тканей поросят с синдромом послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ) был изолирован патогенный цирковирус, названный цирковирусом свиней 2-го типа (ЦВС-2). В России ЦВС-2 впервые был выделен в 2000 году. В последующем его обнаружили при синдроме дерматита и нефропатии свиней (СДНС), репродуктивных нарушениях, патологии органов респираторной, пищеварительной и центральной нервной систем. Молекулярно-генетические характеристики вируса были внесены в базу данных «GenBank» как ЦВС-2. Он принадлежит к роду *Circovirus*, семейства *Circoviridae*.

Цирковирусная болезнь свиней (ЦВБС) имеет статус одной из самых распространенных в свиноводческих хозяйствах по всему миру и наносит значительный экономический ущерб. Об этом свидетельствует уровень

серопозитивности свиней, составляющий 20-80%, а также высокая заболеваемость до 60% и смертность в пределах 3-10%. Несмотря на это воспроизвести клиническую картину болезни при экспериментальном заражении сложно. Для этого необходимо создание условий сочетанной инфекции, которая легко достигается в условиях естественного инфицирования свиней. Существуют проблемы и при диагностике болезни у животных. Для лабораторной диагностики ЦВБС используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), для выявления генетического материала вируса в патологическом материале и иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления противовирусных антител (АТ) в сыворотке крови. Для обнаружения антигена (АГ) ЦВБС-2 в органах животных, используют иммуногистохимическое исследование (ИГХИ), которое позволяет установить связь локализации АГ вируса с развитием патологии, а также выявить бессимптомных носителей ЦВБС-2.

В нашей стране особое внимание было уделено мониторингу болезни, включая генотипирование ЦВБС-2 и филогенетический анализ изолятов вируса, получению рекомбинантного капсидного белка С ЦВБС-2, моноклональных антител к нему, разработке средств специфической профилактики. В то же время, влияние ЦВБС-2 на патогенез и вакцинный процесс в организме свиней изучен не достаточно.

Учитывая вышеизложенное, тема диссертационной работы Стрельцовой Яны Борисовны «Патогенетическая характеристика и идентификация иммунокомпетентных клеток в органах свиней при спонтанном инфицировании цирковирусом второго типа» является актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. К моменту начала работ по теме диссертации в отечественной литературе были опубликованы результаты лишь одного использования ИГХИ с антителами иностранного производства к маркеру Т-лимфоцитов CD2, CD3; к маркеру В-лимфоцитов CD20, к маркеру пролиферации Ki-67 при исследовании лимфоузлов от свиней с признаками СПМИ на фоне хронического отравления поваренной солью. В лимфатических узлах были выявлены изменения структуры, свидетельствующие об имевшей место активации как Т-клеточных, так и В-клеточных зон. В этой связи поставленная диссертантом цель - выявить связь

между наличием патологических изменений, антигена вируса и количеством иммунокомпетентных клеток в органах-мишенях при естественном инфицировании свиней ЦВС-2, используя прямой и непрямой методы ИГХИ, является своевременной.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выполнить исследование патологического материала от свиней с признаками цирковирусной болезни в условиях естественного инфицирования, используя методы ПЦР-РВ и ИФА;

- изучить патологоанатомические и гистологические изменения в органах свиней инфицированных ЦВС-2 в естественных условиях;

- разработать прямой иммуногистохимический метод исследования на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, меченых пероксидазой хрена для определения локализации АГ вируса и его диссеминации в органах инфицированных свиней;

- разработать непрямой иммуногистохимический метод исследования с использованием МАТ мыши к маркерам CD3, CD4 и CD8 - Т-лимфоцитов, CD20 - В-лимфоцитов и CD14 – макрофагов человека для идентификации лимфоцитов и макрофагов в органах свиней;

- сравнить количество и распределение макрофагов и основных популяций лимфоцитов в тканях бронхиальных лимфатических узлов и легких интактных и инфицированных ЦВС-2 животных.

Все задачи поставленные Стрельцовой Я.Б. в рамках данной диссертационной работы, были полностью решены, а поставленная цель достигнута. Выводы рекомендации сделаны на основе результатов проведенных экспериментальных исследований, соответствуют задачам исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0578- 2015-0001 «Разработать метод применения непрямого иммуногистохимического исследования в органах и тканях свиней для диагностики репродуктивного респираторного синдрома свиней и цирковирусной инфекции свиней 2 типа».

Научная новизна работы. Впервые в РФ разработан прямой метод ИГХИ на основе отечественных моноклональных антител (МАТ) мыши 6h12 к

рекомбинантному белку С ЦВС-2, который позволяет выявлять АГ вируса в органах инфицированных свиней.

Впервые в РФ разработан непрямой метод ИГХИ на основе отечественных МАТ мыши к маркерам CD3, CD4, CD8, CD20, CD14 иммунокомпетентных клеток человека в срезах органов свиней. Выполнен сравнительный подсчет основных популяций лимфоцитов и макрофагов в бронхиальных лимфатических узлах и легких интактных и инфицированных ЦВС-2 поросят-отъемышей. Установлено, что органами-мишенями для ЦВС-2 являются бронхиальные, паховые лимфатические узлы и легкие инфицированных свиней.

Определено, что ЦВС-2 оказывает супрессивное действие на исследованные популяции клеток в бронхиальных лимфатических узлах поросят-отъемышей с признаками СПМИ. В легких от этих же поросят супрессии подверглись только макрофаги и В-лимфоциты, при этом численность Т-лимфоцитов была повышена, что указывает на стимуляцию локального Т-клеточного иммунного ответа. Установлено, что гибель и снижение количества иммунокомпетентных клеток в тканях опосредует развитие лимфоидного истощения.

Научная новизна исследований подтверждена получением патента на изобретение № 2695330 от 23.06.2019 «Способ диагностики цирковирусной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител».

Теоретическая и практическая значимость работы. Научные исследования Стрельцовой Я.Б. показывают, что гибель и снижение количества иммунокомпетентных клеток в тканях опосредует развитие лимфоидного истощения, что является основной патогенетической характеристикой ЦВБС.

На основе полученных результатов разработаны методические указания «Имуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», утвержденные секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН от 15.03.2018.

Степень достоверности и апробации результатов исследования. Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертации, подтверждена большим объемом исследований - более 600

образцов патологического материала., методически правильно спланированными экспериментами, статистической обработкой полученных результатов.

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на: - ежегодных отчетах Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН; - Национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения», ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва 2019; - VII Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — АНО «Инновационный центр Кольцово» — ИПЦ НГУ Новосибирск 2020; - XVII Международной научно-практической конференции СФНЦА РАН «Пища. Экология. Качество» Новосибирск 2020; - Международной научной конференции «FarEastCon» Владивосток 2020.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 1 в издании индексируемом в Scopus; 1 патент № 2695330 от 23.06.2019; 1 методическое указание.

Содержание диссертационной работы, ее завершенность и оформление. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список используемой литературы и приложения.

Работа иллюстрирована 19 таблицами и 32 рисунками. Список используемой литературы представлен 176 источниками, из них отечественными в количестве 43, зарубежными – 133. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих научную новизну и практическую значимость работы.

Личный вклад автора. Автором работы выполнен анализ источников зарубежной и отечественной литературы, отбор и обработка патологического материала, патологоанатомическое, гистологическое, ИГХИ органов, проведение ПЦР и иммуноферментный анализ сывороток крови свиней.

Проанализированы результаты работы. Принято участие в разработке методических указаний и патента.

Во «Введении» обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, сформулированы цель и задачи исследований, научная новизна работы, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов исследования, публикации, объем и структура диссертации, личное участие автора.

В разделе «Обзор литературы» приведен анализ литературы, касающийся темы диссертации, характеристики и таксономии цирковируса, эпизоотологические данные, клинических признаков и патологоанатомических изменений при ЦВБС, особенностей смешанных и вторичных инфекций с участием ЦВС-2, патогенез ЦВБС, особенности иммунного ответа при ЦВБС, лабораторная диагностика ЦВБС, иммунопрофилактика ЦВБС. Исходя из этого, автор сделал вывод, что актуальным при изучении ЦВБС, является выявление связи между патологическими изменениями, присутствием АГ ЦВС-2 и количеством основных популяций иммунокомпетентных клеток в органах мишенях инфицированных свиней, что стало целью данной диссертационной работы.

В разделе «Материалы и методы» показано, что работа выполнена в 2017-2022 гг. в секторе патоморфологии на базе ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, где осуществлялись гистологические исследования, разработка и апробация прямого и непрямого методов ИГХИ с целью выявления АГ ЦВС-2 и идентификации иммунокомпетентных клеток в органах свиней. В работе использовались современные материалы, методики и оборудование.

Исследования методами ПЦР-РВ и ИФА выполнялись в лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики вирусных болезней свиней, а также лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Для патологоанатомического, гистологического и иммуногистохимического исследования было отобрано более 600 образцов органов от павших и вынуждено убитых свиней в период с 2017-2022 гг. из свиноводческих хозяйств и комплексов Московской, Новосибирской, Кемеровской, Липецкой, Тамбовской и Белгородской областей. Для постановки ИФА и ПЦР-РВ была использована 101 проба сыворотки крови.

Раздел «Результаты собственных исследований» содержит материалы выполненной работы в соответствии с целью и задачами темы диссертации и имеет 5 основных подразделов в которых описаны результаты исследований по лабораторной диагностике цирковирусной инфекции в исследуемых свиноводческих хозяйствах, патологоанатомические изменения в органах при спонтанной цирковирусной инфекции, гистологические изменения в органах при естественном инфицировании цирковирусом свиней второго типа, выявление антигена ЦВС-2 прямым методом ИГХИ, идентификация лимфоцитов и макрофагов в органах свиней непрямым методом ИГХИ.

В результате законченных исследований изучена распространенность и этиологическая значимость ЦВС-2 в различных регионах Российской Федерации (РФ); выявлены характерные патологоанатомические и гистологические изменения в органах свиней при естественном инфицировании ЦВС-2.

При разработке прямого и непрямого методов ИГХИ были подобраны отечественные материалы и оптимальные условия для их использования в лабораторной практике.

В результате проведенных ИГХИ установлено, что ЦВС-2 в организме естественно инфицированных животных оказывает патологическое действие на ткани бронхиальных, паховых лимфатических узлов и легких. Данные органы являются мишенями для ЦВС-2. Разработанный прямой метод ИГХИ был апробирован в ходе диагностического скрининга ЦВБС в свиноводческих хозяйствах РФ.

Для уточнения особенностей иммунного ответа при ЦВБС был разработан не прямой метод ИГХИ на основе моноклональных антител мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток с целью идентификации и подсчета макрофагов и основных популяций лимфоцитов в органах свиней.

Сопоставляя результаты гистологического, прямого и непрямого метода ИГХИ, диссертант установила, что в бронхиальных лимфатических узлах антиген ЦВС-2 сконцентрирован на мембране и в цитоплазме лимфоцитов и макрофагов коркового вещества, а также паракортикальной зоны. В легких АГ ЦВС-2 находится в цитоплазме и на поверхности лимфоцитов и макрофагов, расположенных в стенках альвеол, а также в просвете бронхов.

Следует отметить, что результаты патологоанатомических и гистологических исследований документированы высококачественными рисунками, представленными в диссертации.

В разделе «Обсуждение» автором проведен сравнительный анализ собственных данных и известных литературных сведений по изучаемой проблеме.

В разделе «Заключение» диссертант констатирует свои достижения.

По итогам выполненных научных исследований сформулировано 8 выводов, соответствующих задачам исследования и положениям, выносимым на защиту.

Диссертация написана автором самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выносимые на защиту. Диссертация свидетельствует о личном вкладе автора в науку.

Рассматриваемая тема диссертационной работы требует дальнейшей разработки и имеет хорошие перспективы.

Список литературы содержит 176 источников, 145 из них зарубежные. Список использованной литературы оформлен в соответствии с требованиями ГОСТ и сопоставим с литературным обзором.

Диссертационная работа носит законченный характер, изложена четким и ясным научным стилем. Содержание автореферата соответствует разделам, изложенным в диссертации и отражает основные результаты исследования.

Оценивая положительно представленную к защите диссертационную работу Стрельцовой Яны Борисовны, отмечая ее завершенность и актуальность хочется получить ответы на возникшие вопросы:

1. Использовались ли при разработке, прямого и непрямого метода ИГХИ тест-системы и реактивы зарубежных производителей.

2. Чем отличаются методы гистохимических исследований от зарубежных аналогов?

3. Существует ли необходимость дифференциации антител к ЦВС-выявленных у вакцинированных свиней методом ИФА.

Заключение.

Диссертационная работа Стрельцовой Яны Борисовны «Патогенетическая характеристика и идентификация иммунокомпетентных клеток в органах свиней при спонтанном инфицировании цирковирусом

второго типа», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по патогенетической характеристике и идентификации иммунокомпетентных клеток в органах свиней при спонтанном инфицировании цирковирусом второго типа, имеющая существенное значение для развития страны.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов, объему и уровню проведенных исследований диссертационная работа соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. с изм., а сам автор работы Стрельцова Яна Борисовна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 - «Инфекционные болезни и иммунология животных».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), доктор биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология, профессор

Груздев Константин Николаевич

09 января 2024 г.

Адрес: 600901 Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец
Тел.: (4922) 26-06-14, (4922) 26-38-77, e-mail:arriah@fsvps.gov.ru
Сайт: www.arriah.ru
Адрес электронной почты: gruzdev@arriah.ru
Тел.: +79107740172; 8-4922- 45-3796

Подпись доктора биологических наук, профессора К.Н. Груздева заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»,

кандидат биологических наук, доцент



Л.Б. Прохватилова