

УТВЕРЖДАЮ

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московская
государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии – МВА имени К.И.
Скрябина» профессор



С.В. Позябин

2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» на диссертационную работу Стрельцовой Яны Борисовны на тему «Патогенетическая характеристика и идентификация иммунокомпетентных клеток в органах свиней при спонтанной инфекции свиней», представленной к публичной защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 - инфекционные болезни и иммунология животных, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук в диссертационный совет 24.1.249.01 при ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Актуальность темы обусловлена этиологическим значением цирковирусов в развитии различных патологий свиней и птиц.

Цирковирусная болезнь свиней (ЦВБС) протекает с поражением органов респираторной, репродуктивной, пищеварительной и центральной нервной систем, часто с субклинической формой, что сильно затрудняет диагностику ЦВБС. Кроме того, для ЦВБС характерно развитие тяжелой патологии органов лимфатической системы.

Для лабораторной диагностики ЦВБС используют полимеразную цепную реакцию, позволяющую определить фрагменты ДНК вируса в патологическом материале, а для выявления противовирусных антител в сыворотке крови - иммуноферментный анализ. Для индикации вирусного антигена цирковируса свиней второго типа (ЦВС-2), а также для идентификации и подсчета лимфоцитов и макрофагов непосредственно в органах и тканях зарубежные специалисты применяют иммуногистохимическое исследование (ИГХИ). Следовательно, цель работы - выявить связь между наличием патологических изменений, антигена вируса и количеством иммунокомпетентных клеток в органах-мишенях при естественном инфицировании свиней ЦВС-2, используя методы

Вх. № 06
09 января 2024 г.

иммуногистохимического исследования - является актуальной.

Научная новизна

Впервые в РФ Стрельцовой Я.Б. разработан прямой метод ИГХИ на основе отечественных 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.

Автором установлено, что органами-мишенями для ЦВС-2 являются бронхиальные, паховые лимфатические узлы и легкие инфицированных свиней, так как в макрофагах, Т- и В-лимфоцитах данных органов локализуется антиген вируса.

Яна Борисовна утверждает, что ЦВС-2 оказывает супрессивное действие на исследованные популяции клеток в бронхиальных лимфатических узлах поросят-отъемышей с признаками СПМИ, так как 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.

Также установлено, что гибель и снижение количества иммунокомпетентных клеток в тканях опосредует развитие лимфоидного истощения, что является основной патогенетической характеристикой ЦВБС.

Практическая значимость работы подтверждена методическими указаниями «Иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», утвержденными секцией зоотехнии и ветеринарии отделения сельскохозяйственных наук РАН от 15.03.2018 г.

Разработанный непрямой метод ИГХИ на основе перекрестно-реагирующих МАТ мыши к CD маркерам иммунокомпетентных клеток человека позволяет идентифицировать лимфоциты и макрофаги в органах, а также может быть необходимым для исследования особенностей иммунного ответа при инфекционных болезнях свиней.

Разработанный прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для выявления локализации АГ вируса в органах свиней автор рекомендует для использования в ветеринарных лабораториях при проведении диагностики ЦВБС и для дифференциальной диагностики схожих по клинической картине заболеваний, так как данный метод позволяет обнаружить антиген ЦВС-2 на мембране и в цитоплазме клеток.

Анализ содержания работы

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 патента № 2695330 от 23.06.2019 «Способ диагностики цирковирусной инфекции свиней второго типа прямым иммуногистохимическим анализом на основании моноклональных антител» и титульного листа методических указаний «Иммуногистохимическая диагностика цирковирусной болезни свиней 2 типа», подтверждающие достоверность результатов работы, её научную новизну и практическую значимость.

Материалы диссертации легли в основу 11 научных публикаций, в том числе 6 статей были опубликованы в изданиях, включенных ВАК Минобрнауки и науки в перечень российских рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации, одна работа в журнале, индексируемом в базе SCOPUS.

В «Обзоре литературы» диссертант проанализировала данные литературы, характеризующие современное состояние вопроса.

Согласно теме диссертационной работы Стрельцова Я.Б. на основании клинической картины выявила синдром послеотъемного мультисистемного истощения у поросят-сосунов и отъемышей, дерматит и нефропатию у откормочных свиней, репродуктивный синдром у свиноматок. Обнаружение антител к ЦВС-2 у 56,4% и генома вируса у 26,7% исследованных животных в хозяйствах Новосибирской, Московской, Кемеровской, Тамбовской, Липецкой и Белгородской областей позволили автору сделать заключение об их неблагополучии по цирковирусной инфекции.

Патологоанатомическим и гистологическим исследованием органов свиней разных технологических групп из неблагополучных по цирковирусной инфекции стад Стрельцовой Я.Б. выявлены фибринозный перикардит, гломерулонефрит и нефропатия, некротизирующий спленит, геморрагическая пневмония, катаральный бронхит с бронхообструкцией и ателектазом, геморрагический и некротический лимфаденит паховых и бронхиальных лимфатических узлов.

В процессе работы над диссертацией согласно цели и задачам автором разработан прямой метод иммуногистохимического исследования на основе отечественных моноклональных антител мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2, применение которого позволило выявить локализацию антигена вируса в легких, паховых и бронхиальных лимфатических узлах спонтанно инфицированных свиней.

Также в процессе работы Стрельцовой Я.Б. установлено, что концентрация антигенпозитивных клеток выше в очагах необратимых патологических изменений тканей, что отражает корреляцию между количеством инфицированных клеток и интенсивностью развития патологии в органе-мишени.

Завершается практическая часть диссертации разработкой непрямого варианта иммуногистохимического исследования на основе моноклональных антител к маркерам иммунокомпетентных клеток человека, что позволило автору идентифицировать макрофаги и основные популяции лимфоцитов в структурах органов-мишеней свиней, спонтанно инфицированных ЦВС-2. Результаты этой части работы подтверждены качественными фотографиями.

Вопросы и замечания

1 В обзоре литературы автор на стр. 34 пишет «Для определения локализации АГ ЦВС-2 в тканях применяют иммуногистохимическое исследование, являющееся золотым стандартом для диагностики ЦВБС [92, 131, 158].». Что нового внесла Стрельцова Я.Б. в протокол проведения иммуногистохимического исследования? Проводили ли сравнительную экономическую оценку зарубежной и отечественной модификации методов ИГХИ?

2 Каковы чувствительность разработанных прямого и непрямого методов ИГХИ и достоверность полученных результатов?

3 Почему для проведения ПЦР Вы в качестве источника фрагментов генома ЦВС-2 используете сыворотку крови свиней, а не иммунокомпетентные клетки?

4 На стр. 45 указано, что для поддержания жидкого состояния парафинаустановлена температура 56°C, а в таблице 3 - 57°C.

5 Моноклональные антитела мыши 6h12 производства АНО «НИИ ДПБ» (Россия) Вы рекомендуете применять в иммуногистохимической реакции в разведении 1:400. Это серийно изготавливаемый препарат? Сколько серий моноклональных антител мыши 6h12 Вы испытали? Достаточно ли, чтобы рекомендовать именно такое разведение?

6 Разработанный прямой метод ИГХИ на основе МАТ мыши 6h12 к рекомбинантному белку С ЦВС-2 для выявления локализации АГ вируса в органах свиней Вы рекомендуете для мониторинга ЦВБС в свиноводческих хозяйствах. Как разработанный Вами метод применить в хозяйствах, ведь это посмертная диагностика?

Тем не менее, учитывая, что материалы диссертационной работы широко представлены научной общественности на 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), а также тематику печатных работ, можно сделать вывод о практической значимости результатов проведенных Стрельцовой Яной Борисовной исследований.

Заключение

Диссертационная работа Стрельцовой Яны Борисовны является законченным научно-исследовательским трудом, по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объему экспериментальных исследований, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациями, а ее автор, Стрельцова Яна Борисовна, заслуживает присвоения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 - инфекционные болезни и иммунология.

Отзыв рассмотрен и одобрен на совещании сотрудников кафедры вирусологии и микробиологии имени академика В.Н. Сюрин федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина», протокол № 8 от 25 декабря 2023 г.

Профессор кафедры вирусологии и микробиологии имени
В.Н. Сюрин федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина»
(109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23)
Доктор биологических наук

Елена Игоревна Ярыгина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина)

Адрес: 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23, тел. (495) 377-49-39, (495) 377-92-86, www.mgavm.ru, e-mail: rector@mgavm.ru