



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 FAO по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Прасоловой Ольги Владимировны «Молекулярно-генетический анализ возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота в хозяйствах северо-западного региона РФ», представленную в диссертационный совет Д 220.059.03 на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Актуальность темы.

Среди многообразия вирусных агентов, вызывающих патологию у крупного рогатого скота, возбудитель вирусной диареи занимает особое место в связи с многообразием клинических проявлений и тяжестью течения болезни. Многие исследователи отводят первичную этиологическую роль в возникновение массовых респираторных болезней молодняка КРС этому вирусу, т.к. инфицированные животные становятся восприимчивыми к развитию секундарной микрофлоры и осложнению инфекционного процесса.

Ощутимые экономические потери, вызываемые вирусом, обусловлены особыми свойствами возбудителя. К наиболее значимым из них относят способность вызывать у животных иммуносупрессию, иммунотолерантность и персистентную инфекцию. Роль вирусов заключается в разрушении клеток эпителия респираторных путей, понижении активности бактериостатических механизмов в легких, воздействии на макрофаги и полиморфно-ядерные нейтрофилы, лейкоциты и T4+-лимфоциты и изменении их функций.

Латентная и персистентная формы болезни осложняют проведение профилактических мероприятий, т.к. приводят к неконтролируемому

распространению возбудителя во внешней среде, где немаловажную роль играют животные-вирусоносители.

В настоящее время актуальным является изучение биологических свойств, циркулирующих в нашей стране генотипов возбудителя вирусной диареи КРС, с целью усовершенствования средств его диагностики, в частности создание валидированных методических рекомендаций для проведения молекулярно-генетического анализа вируса, как вакцинных, так и полевых штаммов и создание схем специфической профилактики на основе выявленных генотипов.

В связи с вышеизложенным, работа Прасоловой Ольги Владимировны «Молекулярно-генетический анализ возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота в хозяйствах северо-западного региона РФ» является своевременной и актуальной.

Целью работы автора было проведение молекулярно-генетического анализа вируса вирусной диареи крупного рогатого скота по нескольким генам в Северо-Западном регионе РФ, осуществление филогенетического анализа выявленных генотипов, разработка схемы оздоровительных мероприятий.

Для достижения поставленной цели диссертанту необходимо было решить следующие задачи: провести мониторинговые исследования этиологической структуры смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота в условиях Северо-Западного региона РФ; выделить вирус на чувствительной культуре клеток; изучить строение генома вируса ВД КРС и выбрать диагностически значимые гены для исследования. Подобрать универсальные праймеры на данные гены, для идентификации всех генотипов вируса, в том числе атипичных, оптимизировать условия ПЦР, создать положительные контроли. Определить специфичность и аналитическую чувствительность методики. Осуществить её метрологическую экспертизу; провести секвенирование генома и филогенетический анализ идентифицированных образцов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота; разработать схему оздоровления хозяйств в Северо-западном регионе РФ.

Общая оценка содержания и оформления диссертации

Представленная соискателем работа изложена на 165 страницах компьютерного текста, включая, в соответствии с требованиями ВАК РФ, введение, обзор литературы, собственные исследования (материалы и методы, результаты, обсуждение), заключение, в котором изложены выводы, основанные на экспериментальных исследованиях автора, практические предложения, список сокращений и условных обозначений, список цитируемой литературы, приложения, в которых приведены сканеры основных практических достижений автора.

Библиографический перечень содержит 191 источник, в том числе 106 отечественных и 85 иностранных. Диссертация иллюстрирована 36 рисунками (фотографиями/диаграммами/ графиками), 15 таблицами.

Во введении диссертант обосновывает выбор темы и ее актуальность, определяет цель и задачи работы, формулирует ее научную новизну и практическую значимость.

В разделе «Обзор литературы» автор дает описание особенности этиологии, патогенеза и клинического проявления болезни, а так же патологоанатомической картины. Также автором значительное внимание уделено описанию структуры возбудителя вирусной диареи и его генома, методам лабораторной диагностики. Описаны методы профилактики, борьбы и ликвидации болезни. Автор, анализируя материалы литературы, обосновывает необходимость проведения настоящей работы.

В разделе «Материалы и методы» представлен объем использованного материала и описана методология исследования.

Раздел «Результаты исследований» представлен в 13 подразделах на 59 страницах рукописи, где последовательно изложен материал по разработке и валидационных испытаниях методики идентификации вируса вирусной диареи крупного рогатого скота.

В рамках идентификации инфекционных агентов, участвующих в респираторной патологии КРС, установлено, что возбудитель вирусной диареи

имеет широкое распространение и был выявлен в 95% случаев из проб патологического материала.

Проведенные исследования по выбору специфических праймеров, подбору оптимальных условий амплификации, анализ специфичности работы олигонуклеотидов послужили основанием для разработки методики по идентификации возбудителя. В результате исследований доказана высокая аналитическая чувствительность метода.

Исследования по секвенированию выявленных изолятов и дальнейший анализ полученных данных свидетельствует о разнообразии генотипов вируса. Идентифицирован нецитопатогенный штамм Deeg и цитопатогенный штамм strain KS86-1 ср, которые относятся к первому генотипу, подтипу а.

Данные полученные в ходе молекулярно-генетических исследований позволят учитывать разнообразие генотипов вирусной диареи и разработать комплексный подход по оздоровлению животноводческих хозяйств.

Достоверность полученных результатов подтверждена статистической обработкой экспериментальных данных. Научные исследования проведены с использованием современного оборудования и методик. Результаты проанализированы и обобщены. Структура и последовательность изложения полученных данных соответствует поставленным в диссертации задачам исследования.

Научная новизна выполненной работы

Автором определена этиологическая структура смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота в условиях Северо-Западного региона РФ. Подобраны оригинальные праймеры для идентификации вируса. При проведении филогенетического анализа автором установлено, что нуклеотидные последовательности вируса ВД КРС, выделенные из хозяйств Северо-Западного региона РФ, являются вакциноподобными и относятся к генотипу I подтипу «а».

Диссертантом разработана схема оздоровительных мероприятий при вирусной диарее крупного рогатого скота.

Практическая значимость работы заключается в том, разработана «Методика генетической идентификации вируса вирусной диареи крупного рогатого скота на основе секвенирования фрагментов генома; «Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике вирусной диареи крупного рогатого скота»; «Методические рекомендации по проведению оздоровительных мероприятий при вирусной диарее крупного рогатого скота в хозяйствах Ленинградской области».

Апробация результатов. Диссертационная работа широко апробирована

На: 7 Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием -2015, (Москва); II международном Ветеринарном Конгрессе International VETistanbul Group Congress-2015 (Санкт-Петербург); Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященной 85-летию зоотехнического образования в Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана, 2015 год, (Казань); Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, методы борьбы и профилактика», 2015, (Москва); Международной научно-практической конференции молодых ученых «МОЛОДЕЖЬ И ИННОВАЦИИ–2015» УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», (Горки) 2015г.; Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы морфологии и биотехнологии», 2015, (Самара); Всероссийской научно-практической конференции «Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии», 2015 (Санкт-Петербург); 7 International Conference «Global Science and Innovation», 2016 год, Чикаго, США; 4-ом Европейском конгрессе Европейской ассоциации ветеринарной лабораторной диагностики (EAVLD), 2016 (Прага, Чехия); 4 Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016г. (Владимир). IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017»

(Москва). Материалы диссертации доложены и обсуждены на ежегодных отчетных научных и учебно-методических конференциях профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (Санкт-Петербург, 2014, 2015, 2016).

Материалы диссертации легли в основу 16 научных работ, в том числе 4 статей были опубликованы в изданиях, включенных ВАК Минобрнауки в перечень российских рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертации. Сформулированные теоретические положения и обоснованные экспериментальные решения, а также разработанные Методические рекомендации, могут быть рекомендованы для использования в работе других научных лабораториях и учреждениях ветеринарного профиля.

Замечания по работе. При рассмотрении диссертационной работы, отмечен ряд неточностей и недочетов, которые автор должен учесть, а на некоторые дать пояснения:

- диссертация иллюстрирована 36 рисунками, необходимо пояснить, чем обусловлено использование в ряде случаев скриншот графиков в оформлении результатов, притом, что программное обеспечение Rotor-gene позволяет получить картинки в JPG формате.

- на стр. 69 в разделе 3.3.1 автор использует формулировку «серологические исследования» и «диагностически значимый титр», что требует более конкретного указания метода исследования, т.к. диагностический титр для каждого метода исследования может быть различным;

- на стр. 72 раздел 3.3.2 «выделение вируса на культуре клеток» не указаны основные параметры метода вирусыведения возбудителя на культуре клеток: вид ЦПД, на какие сутки вирус вызывает ЦПД, титр инфекционной активности, было ли использование нескольких культур и чем обусловлен

выбор культуры клеток – КСТ? Кроме того, неясно количество выделенных изолятов?

- требуется пояснить использовались ли референтные образцы (штаммы) для определения специфичности метода?

- на стр. 91 по тексту указано «...В результате секвенирования образцов из хозяйства показано, что нуклеотидные последовательности вируса ВД КРС из образца отличаются от последовательностей штаммов, входящих в состав отечественных и зарубежных вакцин, применяемых для профилактики болезни», работу бы скрасило предоставление данных проведенного анализа, в том числе анализ возможных рекомбинантов;

Указанные замечания не снижают общего положительного впечатления, поскольку достигнута основная задача и очевидна ценность выполненной работы и полученных результатов.

Заключение

На основании тщательного всестороннего анализа диссертации Прасоловой Ольги Владимировны на тему «Молекулярно-генетический анализ возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота в хозяйствах северо-западного региона РФ» можно сделать заключение, что она является самостоятельно выполненной, завершенной научной-квалификационной работой, в которой содержится решение научно-практической задачи по изучению молекулярно-генетических свойств вируса вирусной диареи крупного рогатого скота по нескольким генам в Северо-Западном регионе РФ, осуществление филогенетического анализа выявленных генотипов, разработка схемы оздоровительных мероприятий.

Автореферат соответствует содержанию работы, выводы и предложения обоснованы представленным экспериментальным материалом.

Работа по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объему исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов, методологической зрелости автора отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с

п.п. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученой степени», а ее автор Прасолова Ольга Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

заведующий референтной лабораторией
болезней крупного рогатого скота
ФГБУ «ВНИИЗЖ»,

кандидат ветеринарных наук

(4922) 26-15-12, доб.23-04

kononov@arriah.ru



Александр Владимирович Кононов

2 марта 2018г.

Подпись А.В.Кононова заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»

доктор ветеринарных наук, профессор



В.С. Русалеев