

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Герши Ашуак** «Генотипизация вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота, выделенного в Республике Татарстан», представленную на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Актуальность темы исследования

Массовые заболевания органов дыхания у крупного рогатого скота являются одной из основных причин экономического ущерба в животноводстве. По широте распространения, смертности, вынужденному убою, недополучению привесов, заболевания органов дыхания у молодняка крупного рогатого скота респираторные болезни превалируют над всеми другими патологиями. Как правило, первые признаки респираторной патологии появляются через 5-10 дней после технологической перегруппировки и перевода телят из родильного отделения в профилакторий. При традиционной технологии ведения скотоводства на долю респираторной патологии приходится 30-40%, а при промышленной-свыше 60% всех случаев заболевания телят.

Респираторные заболевания молодняка крупного рогатого скота чаще всего протекают по типу смешанных инфекций. Работами многих исследователей установлено, что основную роль в возникновении первичных респираторных патологий играют вирусы парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи (1,2 и 3 генотипов), респираторно-синцитиальный вирус, коронавирус, герпесвирусы КРС 4 и 5 генотипов. Нормальная (условно-патогенная) микрофлора верхних дыхательных путей клинически здорового КРС (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* тип А и Д, *Haemophilus somnus*, *Actinomyces pyogenes* и *Mycoplasma bovis*) способствует развитию вторичных инфекций после репликации вирусов. Установлено, что вирусы парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции, вирусной диареи и др. вызывают иммуносупрессию, включая нарушения функций альвеолярных макрофагов и лимфоцитов. Зарегистрированы случаи возникновения респираторных заболеваний взрослого крупного рогатого скота вызванных вирусами парагриппа-3, возбудителями вирусной диареи, коронавирусом и условно-патогенных микроорганизмов. Установлены факты респираторных заболеваний у

вакцинированных телят. Ветеринарными специалистами проводившими эпизоотологическое расследование в очагах заболевания было предположено, что эпизоотический вирус ПГ-3 отличался от вакцинного. Все свидетельствует об актуальности диссертационной работы Гериш Ашуак, посвященной молекулярно-генетическому анализу вируса парагриппа-3, с целью установления его геномной принадлежности.

Методологической основой проведенных исследований явилось обоснование возможности применения молекулярно-генетических методов для установления генотипа вируса парагриппа-3 КРС в Республике Татарстан. При выполнении работы были использованы клинико-эпизоотологические, физико-химические, гистоморфологические, серологические (РН, РНГА, РТГА), иммунохимические (ИФА), вирусологические и молекулярно-биологические (ПЦР, секвенирование) методы.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы явилось генотипирование эпизоотического штамма вируса парагриппа-3 КРС, выделенного в Республике Татарстан. Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить распространение вирусных респираторных болезней КРС в отдельно взятых хозяйствах.

2. Изучить биологические свойства изолятов вируса ПГ-3 КРС, выделенных на территории РТ.

3. Определить пригодность коммерческих праймеров для ПЦР в дифференциации изолятов вируса ПГ-3.

4. Провести секвенирование частично матричного гена и филогенетический анализ изолята изучаемого вируса ПГ-3 КРС.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

При выполнении данной работы было проведено эпизоотологическое расследование в неблагополучных по респираторным заболеваниям молодняка животноводческих хозяйствах Альметьевского, Чистопольского, и Лаишевского районов Республики Татарстан. У больных телят отмечались гипертермия (40,9-41,4°C), затрудненное дыхание, слизисто – гнойные выделения из носа. При вскрытии трупов павших телят отмечали участки ателектаза и эмфиземы легких. Легкие наполнены воздухом с красно-

порпурными твердыми участками. Были отмечены случаи отека легких. Лимфатические узлы увеличены и отечны. При гистологических исследованиях легких были выявлены изменения характерные для хронической бронхопневмонии, сопровождаемой компенсаторной хронической альвеолярной эмфиземой, образованием из эпителия альвеол многоядерных симпластов и многоклеточных синцитиев, а также смешанных цитопатических форм респираторного эпителия (симпластов-синцитий), что явилось характерным цитологическим признаком проявления хронической парагриппозной инфекции. Хронический воспалительный процесс в легких при парагриппе осложнялся фибринозным плевритом, а также пери- и эндокардитами, миокардиодистрофией с нарушением структуры кардиомиоцитов и атипичных клеток сердца. В легочных лимфатических узлах больных парагриппом телят отмечали умеренно выраженную гиперплазию клеток лимфоидной ткани с наличием вторичных лимфатических узелков. Из проб патологического материала в культуре клеток ПЭК был изолирован цитопатический агент (ЛД-9), который вызывал дегенеративные изменения в монослое клеток в течение 98-124 часов. Для проведения исследований автором использованы современные методы, в том числе секвенирование методами Сенгера и «Next-Generation Sequencing», которые позволили значительно сократить стоимость базового секвенирования и значительно сэкономить время для индикации вируса и диагностики болезни. На основании филогенетического анализа описаны три генотипа вируса ПГ-3, обозначенные А, В и С. Генотип А вируса ПГ-3 впервые был выделен в США, генотип В - в Австралии, генотип С - в Китае. Однако нет данных о том, какие генотипы возбудителя циркулируют на территории Российской Федерации.

Диссертантом были проведены исследования по изучению биологических и физико-химических свойств изолята ЛД-9 вируса ПГ-3. Большой объем исследований проведен по молекулярно-генетической дедукции, а также секвенированию и филогенетическому анализу изолята(ЛД-9) вируса ПГ-3.

Научная новизна

В результате проведенных комплексных клинико-эпизоотологических, гистологических, серологических и вирусологических исследований был выделен и изучен полевой изолят ЛД-9 вируса парагриппа-3 КРС от телят с признаками респираторной патологии. Впервые проведено секвенирование

фрагмента М гена изолята вируса парагриппа-3 КРС, выделенного на территории РТ. Установлено его отличие от последовательности генома штамма ПТК-45/86, который используется для профилактики парагриппа-3 на территории Российской Федерации. По данным филогенетического анализа изолят ЛД-9 вируса ПГ-3 КРС, выделенный в Республике Татарстан, относится к генотипу А. Установлено распространение этого возбудителя в регионе. Показана эффективность ПЦР-РВ для индикации вируса ПГ-3 КРС, не требующего выделения и культивирования самого возбудителя. Расшифрованные последовательности генома изолята ЛД-9 вируса ПГ-3 КРС зарегистрированы в GenBank под номером MW524841. Выделенный возбудитель (ЛД-9) имеет некоторые отличия от референтного штамма в последовательности исследуемого фрагмента М гена (98% идентичности). Изолят ЛД-9 и вакцинный штамм ПТК-45/86 вируса парагриппа крупного рогатого скота принадлежат к одному и тому же генотипу А, и находятся в том же кластере, что и эталонный штамм SF-4 вируса ПГ-3. Известно, что генотип А вируса ПГ-3 может быть 3 субгенотипа в зависимости от степени дивергенции. Установлено, что изолят ЛД-9, вакцинный штамм ПТК-45/86 и эталонный штамм SF-4 вируса ПГ-3 относятся ко второму субгенотипу.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате эпизоотологических обследований неблагополучных по респираторной патологии КРС на территории Республики Татарстан, клинического осмотра больных животных, вирусологических, серологических, гистологических исследований был выделен и идентифицирован изолят вируса ПГ-3 КРС и проведено его генотипирование. Геном изолята ЛД-9 вируса ПГ-3 КРС зарегистрирован в GenBank под номером MW524841. Результаты проведенных исследований вошли во «Временные правила по геотипированию вируса ПГ-3», утвержденные научно-техническим советом ФГБОУ ВО «Казанская ГАВМ», 12 марта 2021г.

Степень достоверности и апробации результатов

Материалы диссертации доложены, обсуждены и одобрены:

-на Международной научно-практической конференции «Сельское хозяйство и продовольственная безопасность: технологии, инновации, рынки, кадры», посвященной 100-летию аграрной науки, образования и просвещения в Среднем Поволжье (г. Казань);

- в конкурсе на предоставление грантов в форме субсидий на реализацию научных исследований и разработок в области агропромышленного комплекса в 2020 году «Молекулярно-генетический анализ вируса парагриппа -3 КРС, циркулирующего в Республике Татарстан» (г. Казань, 2020).

Публикации результатов исследований

Научные положения диссертации, и ее основные результаты исследований опубликованы в 6-ти печатных работах, в том числе 3 статьи – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, одна статья – в издании, включенном в базу данных Web of Science.

Изолят ЛД-9 вируса ПГ-3 КРС был зарегистрирован в GenBank под номером MW524841.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 125 страницах компьютерного текста, включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, практические предложения, список использованной литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 22 рисунками и 8 таблицами. Список литературы включает 158 источников, в том числе 76 отечественных и 82 иностранных. Автореферат включает все требуемые структурные элементы и в краткой форме отражает основное содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Гериш Ашуак нет, по своему содержанию, научному и практическому значению соответствует требованиям п.9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утв. постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842, но хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

- 1) Влияют ли субгенотипные различия вируса парагриппа-3 на полевую эффективность вакцин, используемых для профилактики ПГ-3 в РТ;
- 2) Имеется ли необходимость проведения подобных исследований при подборе кандидатов в производственные штаммы возбудителя?

Заключение

Диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, содержит новые научные данные, обоснованные выводы и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Работа имеет практическое значение и свидетельствует о личном вкладе автора диссертации в науку.

Диссертационная работа отвечает критериям Положения о порядке присуждения ученых степеней, а ее автор, Гериш Ашуак, заслуживает присуждения ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент,
доктор ветеринарных наук,
профессор, главный научный
сотрудник лаборатории
профилактики болезней свиней и
рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Почтовый адрес: г. Владимир,
Юрвец, Институтский городок, 33.
Тел. +7(4922) 260614
Email: mishenko@arriah.ru


Владимир Александрович Мищенко

Подпись официального оппонента

25.10.2021 г.

Заверено

Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
д.в.н., профессор


Владимир Сергеевич Русалеев

