

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ

Ростовский-на-Дону

противочумный институт

Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

С.В.Титова

« _____ » 2017 г

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального казённого учреждения здравоохранения
«Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский
противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека

Диссертация «Эффективные приёмы видовой идентификации атипичных штаммов возбудителей чумы, псевдотуберкулёза и их рекомбинантов» выполнена в лаборатории микробиологии чумы и других иерсиниозов в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В период подготовки диссертации соискатель Арсеньева Татьяна Евгеньевна работала в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора в лаборатории микробиологии чумы и других иерсиниозов в должности научного сотрудника.

В 1996 г. Арсеньева Т.Е. окончила Ростовский государственный университет по специальности биология.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано Федеральным казённым учреждением здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель – Лебедева Светлана Александровна, доктор медицинских наук, профессор, работает в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в лаборатории микробиологии чумы и других иерсиниозов ведущим научным сотрудником.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Арсеньевой Татьяны Евгеньевны является завершённой научно-квалификационной работой, которая посвящена разработке широкодоступных, надёжных и экономных по материальному обеспечению приемов идентификации и видовой дифференциации типичных, атипичных и рекомбинантных штаммов возбудителей чумы и псевдотуберкулеза в чистых, смешанных культурах и в исследуемом инфицированном биологическом материале. Исследован компонентный состав использованного в работе диагностического антигена FV, проведена приоритетная молекулярно-биологическая идентификация его компонентов. Исследование проведено на современном методическом уровне и имеет научно-практическую направленность.

Проблема существования штаммов с измененными диагностическими свойствами давно известна. Создание методов их безошибочной диагностики и характеристики их патогенетической активности является крайне актуальными.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Все данные, составляющие основу диссертации, получены лично соискателем Т.Е. Арсеньевой. Масс-спектрометрия проводилась в сотрудничестве со специалистами Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора», Оболенск, Московской области.

Автор диссертации лично участвовала в постановке задач, разработке цели научных исследований. Самостоятельно проводила отбор и анализ атипичных вариантов из коллекции 352 штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и 155 их клонов, выполняла иммунохимические тесты, ПЦР-анализ, постановку и исследование биопроб на трёх видах лабораторных животных, иммунохимическое исследование комплексного антигена чумного микроба FV, готовила апробацию результатов, подготавливала доклады и публикации и выполняла написание диссертации.

Соискатель владеет всеми основными микробиологическими, биологическими, иммунохимическими, биохимическими и молекулярно-биологическими методами, использованными в диссертации. При проведении биоинформатических исследований использовалось компьютерное программное обеспечение. При идентификации одного из компонентов изучаемого в диссертации антигена FV и его структурного гена использовались данные NCBI nr и программы Mascotsearchingengine V.2.1 (Matrix Science, London, UK). Анализ нуклеотидных последовательностей гена осуществляли с помощью программы BLAST ncbi. Для характеристики выделенного белка применяли Signal P 4,0; трансмембранных альфа-спиральных областей белков – TMHMM Server v 2.0. Выявление бета-спиральных участков белков проводили с помощью серверов BOMP. Для установления клеточной локализации выбранного белка использовали серверы PSORTb 3.0.2. При необходимости статистической

обработки данных биологических тестов использовали рекомендации известного руководства [Ашмарин, Воробьёв, 1986].

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований обусловлена тем, что при выполнении работы были использованы современные методы микробиологии, иммунобиологии, генетики, молекулярной биологии и обработки информации. Эксперименты выполнялись с использованием сертифицированного оборудования. В диссертационной работе проведено сравнение авторских результатов с данными, опубликованными ранее в мировой литературе по исследуемой тематике. Научный подход к решению поставленных задач, большой объём экспериментальных данных, объективность обсуждения материалов даёт возможность констатировать, что выдвинутые научные положения и сформулированные на их основе выводы обоснованы в достаточной степени.

Новизна и теоретическая значимость проведенных исследований.

Впервые дана систематизированная оценка эффективности общепринятых тестов идентификации *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* на модели атипичных штаммов этих видов; сделано заключение о недостаточной надёжности определённых признаков, связанных с оригинальными плазмидными и хромосомными генами, видовая стабильность которых недостаточно охарактеризована; сформулирована концепция о необходимости совершенствования общепринятых приёмов дифференциации иерсиний.

Впервые доказана стабильность встройки IS100 элемента в видоспецифическом консервативном локусе гена, определяющего синтез белка систем секреции семейства Dot U (праймеры группы vlm), и сохранение её у всех представителей таксономических вариантов *Y. pestis* при всех известных формах их природной изменчивости, в процессе многократных пассажей бактерий через организм чувствительных к чуме животных и на питательных средах, а также при длительном хранении штаммов в лабораторных условиях и при клоновом анализе. Это позволяет отнести этот фрагмент к таксономическим показателям вида.

Полученные сведения об отдельных этапах формирования патогенетически активных атипичных природных Fra⁻ и Fra[±] штаммов *Y. pestis*, уклоняющихся от диагностики по основному диагностическому антигену F1; доказывают, что спонтанные дефекты могут дискретно возникать в любом из четырёх *caf*-оперона плазмиды pFra.

В отличие от разных биопробных животных впервые установлена уникальная высокая чувствительность монгольских песчанок к Fra⁻ штаммам *Y. pestis*.

Доказано, что приобретение pFra плазмиды бактериями *Y. pseudotuberculosis* (предполагаемый эволюционный механизм) приводит к формированию атипичного «смешанного» фенотипа у рекомбинантов, которые обладают атипичным патогенезом.

Доказана стабильность иммуноактивных эпитопов видоспецифического для *Y. pestis* комплексного антигена FV, в отличие от F1 антигена, при всех типах природной изменчивости фенотипа микроба чумы и перспективность изучения этого антигена для совершенствования диагностики чумы и решения фундаментальных проблем, связанных с её возбудителем.

Впервые определён один из иммуноактивных компонентов FV-антигенного комплекса чумного микроба (фермент трансальдолаза), идентифицирована его аминокислотная последовательность, структурный ген, охарактеризована экспрессия, показана перспективность дальнейших исследований в аспекте решения проблем иммунодиагностики и профилактики двух видов иерсиний.

В сумме это открывает возможности более глубокого исследования теоретических и практически ориентированных аспектов проблемы атипичных штаммов иерсиний, решение которой необходимо для гарантированного эффективного контроля над природными очагами чумы и совершенствования приёмов, препятствующих её распространению и способствующих раскрытию механизмов длительного сохранения возбудителей инфекций в природных очагах.

Практическая значимость результатов исследования.

Составлена коллекция атипичных природных и селективных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, имеющих типы изменчивости, полезные для апробации новых дифференциальных тестов и препаратов, позволяющих идентифицировать бактерии чумы и псевдотуберкулёза, а также проводить исследования фундаментальных механизмов изменчивости.

В результате определения частоты изменчивости диагностических признаков у штаммов музейной коллекции впервые дана систематизированная сравнительная оценка надёжности рекомендуемых инструкциями фенотипических диагностических тестов в отношении атипичных штаммов иерсиний и их клонов, и предложен новый подход к видовой таксономической идентификации двух близкородственных иерсиний.

Наличие обнаруженных стабильных видоспецифичных для *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* консервативных фрагментов хромосом, комплементарных парам праймеров группы «vIm» («vIm12/IS216», «vIm33/IS1754») или «JS», соответственно указанным видам, обеспечило возможность универсального использования этих праймеров в

моноклусной ПЦР для безошибочной идентификации типичных и атипичных штаммов *Y. pestis*, включая фенотипически сходные штаммы с *Y. pseudotuberculosis*, в чистых и смешанных культурах, а также в биоматериале: (а) при первичном скрининге в обследовании природных очагов; (б) при работе СПЭБ; (в) в генетических, микробиологических и таксономических научных исследованиях.

Доказано существование уникальных изменённых природных штаммов *Y. pestis*, атипичных по антигену F1: в ПЦР-анализе их ДНК позитивно реагирует с праймерами из группы «vIm» и предложенными нами праймерами «cafM,A,R(alt)», но не с рекомендованными праймерами «3a» на видоспецифический для *Y. pestis* фрагмент хромосомы и «cafI» на pFra плазмиду, что требует особых подходов к диагностике. Надёжность ПЦР с исследованными праймерами выше бактериологических тестов, принятых в практике, и при позитивном результате может быть сигналом для более тщательного поиска трудно культивируемых штаммов.

Доказано, что при нарушениях *cafI* гена, которые препятствуют образованию специфических ампликонов с *cafI* и F1 праймерами, интактные гены *cafM*, *cafA*, *cafR*, не способные самостоятельно обеспечивать синтез F1-антиген, в ПЦР-анализе могут быть видоспецифическими мишенями соответствующих праймеров и свидетельствовать о принадлежности этих штаммов к виду *Y. pestis*.

Впервые показано, что рекомбинантные бактерии возбудителя псевдотуберкулёза с pFra плазмидой в смешанных очагах обитания обоих видов иерсиний в органах носителей и при научных исследованиях могут быть обнаружены в агаровых культурах по позитивным результатам ПЦР с предложенными праймерами на разные гены *caf*-оперона и специфическими «хромосомными» праймерами «JS»; при отрицательных результатах со специфическими для *Y. pestis* праймерами «vIm12/IS216».

Создана коллекция Fra⁻ штаммов *Y. pestis* с изменением комплементарности отдельных фрагментов *cafR*-, *cafI*-, *cafA*- и *cafM*- генов *caf*-оперона, полезная при оценке роли продуктов этих генов в патогенетической активности.

Использованная нами биомодель монгольских песчанок, проявивших большую чувствительность к чуме, вызванной Fra⁻ штаммами *Y. pestis*, способна повысить: (1) эффективность биологического метода выявления «бесфракционных» штаммов и (2) результативность анализа механизмов их вирулентности у организмов с разным уровнем активности иммунной системы.

Полученные данные, характеризующие антигенный комплекс FV у *Y. pestis* создали базу для дальнейших исследований: (1) клонирования гена *tal*; (2) генно-инженерного

создания Tal-продуцентов; (3) изучение влияния на вирулентность и иммуногенность и (4) продолжения анализа состава антигенного комплекса FV.

Предложены и утверждены директором ФКУЗ Ростовский–на–Дону противочумный институт Роспотребнадзора: «Методические рекомендации, по применению ПЦР для видовой и внутривидовой идентификации *Y. pestis*», позволяющие идентифицировать атипичные штаммы *Y. pestis ssp. pestis* (протокол №10 от 28.08.08г.); Методические рекомендации по ПЦР-детекции и иммуноанализу микст-культур *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (протокол № 14 от 18.12.2009г.); «Методические рекомендации по детекции возбудителей *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* в органах биопробных животных» (протокол № 16 от 22.12.2010г) внедрённые в практику при обследовании природных станций юга России на заражённость возбудителем чумы, а также «Методические рекомендации по получению препарата антигенного комплекса возбудителя чумы» (Протокол №2 от 17.12.15)

Разработан способ идентификации штаммов вида *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (Патент № 2422535. Приоритет 11.01.2010).

Материалы диссертации используются в лекциях на курсах усовершенствования специалистов по ООИ при РостНИПЧИ и в практике обследования природных станций на заражённость исследованными иерсиниями (подтверждено актами внедрения).

Основные результаты исследований представлены в Патенте № 2422535(RU) с приоритетом от 11.01.2010), четырёх методических рекомендациях и в 21 публикации, из которых 5 статей опубликованы в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ Министерства образования и науки, 2 статьи в электронном журнале *Universum: химия и биология*, 13 публикаций в сборниках, трудах и материалах Всероссийских и Международных научных конференций.

Диссертационная работа Арсеньевой Татьяны Евгеньевны на тему «Эффективные приёмы видовой идентификации атипичных штаммов возбудителей чумы, псевдотуберкулёза и их рекомбинантов» представляет собой самостоятельно выполненную автором научно-квалификационную работу, результаты которой обеспечивают решение теоретических и практических задач в области диагностики возбудителей чумы и псевдотуберкулёза и контроля над ними.

практических задач в области диагностики возбудителей чумы и псевдотуберкулёза и контроля над ними.

Диссертация Арсеньевой Т.Е. на тему «Эффективные приёмы видовой идентификации атипичных штаммов возбудителей чумы, псевдотуберкулёза и их рекомбинантов» соответствует специальности 03.02.03 – микробиология по пунктам 2, 3 и отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Общеинститутская научная конференция ФКУЗ «Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека рекомендует работу к защите.

Заключение принято на общеинститутской научной конференции ФКУЗ «Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Присутствовали на заседании – 61 человек. Результаты голосования: «за» - 61 человек, «против» - 0 человек; «воздержалось» - 0 человек, протокол № 5 от 16.08.16 г.

Алексеева Людмила Павловна, доктор
биологических наук, профессор,
зав. лабораторией гибридом
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Личную подпись Л.П. Алексеевой
«Заверяю»
Начальник отдела кадров
Е.Е. Стоян



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]