



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного  
Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора**

664047 Иркутск, Трилиссера, 78

Тел. 22-01-35, факс 22-01-40

E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

<http://www.irkutsk.ru/chumin>

ОКПО 01898090, ОГРН 10223801543017

ИНН/КПП 3811015807/381101001

04.09.2017 № 1018  
На № 21-04/711 от 21.06.2017г.

[ ]

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ Иркутский научно-  
исследовательский противочумный  
институт Роспотребнадзора, профессор

 С.В. Балахонов

«30» августа 2017 г.

**ОТЗЫВ**

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Арсеньевой Татьяны Евгеньевны «Эффективные приёмы видовой идентификации атипичных штаммов возбудителей чумы, псевдотуберкулёза и их рекомбинантов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

**03.02.03 – микробиология**

**Актуальность избранной темы исследования.** Известно, что возбудитель особо опасного для человека инфекционного заболевания чумы - *Yersinia pestis* генетически очень близок к *Y. pseudotuberculosis*, другому патогену, вызывающему у людей псевдотуберкулез. Наиболее очевидные геномные отличия *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* характеризуются наличием двух дополнительных плазмид pFga и pPst, а также особенностями в структуре липополисахарида клеточной стенки у этих бактерий, что определяет ряд фенотипических различий и отличия в патогенезе двух разных заболеваний у человека.

Актуальность исследования определяется необходимостью совершенствования способов

дифференциации весьма близкородственных видов рода *Yersinia* — *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Это позволит успешнее решать проблемы диагностики и эпидемиологии чумы, а также регламентировать таксономические позиции всех групп, составляющих вид *Y. pestis*, и классифицировать их природную вариабельность.

Действующими нормативными документами определены критерии идентификации вида *Y. pestis* и дифференциации его от *Y. pseudotuberculosis*. Они включают помимо ряда фенотипических признаков, не всегда стабильных, и биологического теста на модели лабораторных животных, постановку ПЦР с праймерами на гены плазмид (*cafI*, *IcrV* и *pla*) и праймерами («3а», *igr2*, *hms*), комплементарными к видоспецифическим фрагментам хромосомы *Y. pestis*. Данный подход позволяет решать вопросы диагностики классических форм заболевания чумой и выявлять типичные штаммы возбудителя, но не охватывает всего разнообразия форм, составляющих вид, а, именно, существование возможных атипичных вариантов возбудителя чумы.

Для идентификации изолятов чумного микроба в настоящее время регламентирован к применению набор «Ген *Yersinia pestis* идентификация - РГФ», позволяющий определять известные «плазмидные» и «хромосомные» маркеры *Y. pestis*, однако, на сегодняшний день отсутствуют сведения о его эффективности в отношении изменённых, атипичных штаммов чумного микроба, смешанных культур и рекомбинантов двух видов иерсиний.

При существующих отличиях у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* в структуре ЛПС клеточной стенки *Y. pseudotuberculosis* продуцирует полноценный О- антиген (S-форма ЛПС). Для *Y. pestis* характерен ЛПС, лишённый О-боковых цепей (R-форма ЛПС). У обеих иерсиний возможно существование переходной формы ЛПС, а также, изменение фенотипических свойств, при которых видовую принадлежность иерсиний трудно определить. Клеточная поверхность большинства штаммов *Y. pestis* экранирована капсулой, основой которой является антиген F1 (Саfl). Видоспецифическая плаزمида рFга с *caf*- генами может иногда утрачиваться у штаммов *Y. pestis* или нести мутации в *caf*-генах. Это приводит к утрате синтеза антигена F1. Существуют варианты F1, затрудняющие диагностику *Y. pestis*. В связи с этим актуален выбор другого видоспецифического антигена, стабильно сохраняющегося при всех видах изменчивости. Таким в диагностике может быть описанный недавно специфичный для *Y. pestis* комплекс антигенных белков «фракция V» (FV, F5). При этом работы по анализу этого комплекса у атипичных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* с последующим отбором наиболее иммуноактивных компонентов не проводились. Такие исследования представляются

весьма актуальными для изучения иммуногенеза при чуме и совершенствования приёмов диагностики.

В связи с этим тема диссертационной работы Арсеньевой Т. Е. направленная на получение новых данных о полиморфизме возбудителя чумы и псевдотуберкулёза, научное обоснование выбора и практическая оценка эффективности использования альтернативных молекулярных мишеней для индикации и идентификации, несомненно, актуальна и соответствует требованиям современной науки и практики.

**Новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.** Новизна исследования и полученных автором результатов заключается в том, что впервые в составе антигенного комплекса FV *Y. pestis* идентифицирован иммунодоминантный белок фермент - адгезин трансальдолаза. По аминокислотной последовательности определена структура у *Y. pestis* tal-гена.

Впервые установлено, что у природных атипичных Fra<sup>-</sup> и Fra<sup>±</sup> штаммов *Y. pestis*, сохраняющих плазмиду rFra, природный спонтанно возникающий дефект может быть локализован в любом из четырёх генов saF-оперона.

Доказано, что при снижении вирулентности таких штаммов для многих носителей, монгольские песчанки проявляют к ним высокую чувствительность.

Доказано, что приобретение rFra плазмиды бактериями *Y. pseudotuberculosis* (предполагаемый эволюционный механизм) повышает для белых мышей патогенетическую активность и значительно усиливает иммуногенность в отношении мышей и морских свинок при этом снижаются антифагоцитарные свойства рекомбинантов. Это происходит, возможно, из-за конкурентного отношения ЛПС с антигеном F1, который у рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* продуцируется в недостаточно высоком титре.

**Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации.** Предложена гипотеза, объясняющая диагностически значимые различия в экспрессии трансальдолазы в клетках чумного и псевдотуберкулёзного микробов.

Отобрана репрезентативная коллекция из клоновых, референтных штаммов чумного и псевдотуберкулёзного микробов, рекомбинантных культур возбудителя псевдотуберкулёза и атипичных вариантов двух видов иерсиний с единичными и множественными изменениями дифференцирующих свойств, определена частота их изменчивости и дана сравнительная оценка надёжности рекомендуемых инструкциями фенотипических диагностических тестов. Коллекция может быть полезной при разработке новых тестов идентификации.

Практическую ценность представляют материалы исследования, использованные при написании четырех методических рекомендаций учрежденческого уровня и оформлении одного патента: «Методические рекомендации по применению полимеразной цепной реакции при видовой идентификации и внутривидовой дифференциации бактерий вида *Y. pestis*»; «Методические рекомендации по получению антигенного комплекса «фракция V» чумного микроба»; «Методические рекомендации по анализу и диагностике микстов возбудителей чумы и псевдотуберкулёза»; «Методические рекомендации по индикации возбудителей *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* в органах биопробных животных»; Патент № 2422535 «Способ идентификации штаммов вида *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*».

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.** Научные положения, выводы, заключение, сформулированные автором, логичны, теоретически обоснованы и основаны на достаточном фактическом материале, полученном в экспериментальных исследованиях с использованием современных микробиологических, биохимических, генетических, биологических, молекулярно-биологических, биоинформационных и статистических методов исследования, адекватных поставленной цели и задачам исследования. Полученные материалы репрезентативны, статистически обработаны, тщательно проанализированы, что обеспечивает объективность выдвинутых положений и выводов. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, отражены в выводах, вытекающих из результатов проделанной работы и соответствуют поставленным целям и задачам.

**Оценка содержания диссертации, ее завершенность.** Диссертационная работа Арсеньевой Т. Е. выполнена в лаборатории микробиологии чумы и других иерсиниозов в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте в рамках пяти плановых тем НИР.

Диссертация представлена на 233 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, шести глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и литературы. Список литературы представлен 207 отечественными и 143 зарубежными источниками. Работа иллюстрирована рисунками и таблицами.

Раздел «Введение» содержит основную информацию о проделанной работе. Для достижения цели исследования диссертантом определено 4 задачи, отражающих последовательность основных этапов работы.

В обзоре литературы детально дана характеристика двух эволюционно связанных видов иерсиний. Описаны общие представления о чуме и псевдотуберкулезе и их возбудителях, представлена характеристика основных микробиологических признаков идентификации возбудителя эпидемической чумы *Y. pestis* subsp. *pestis* и дифференциации его от *Y. pseudotuberculosis*. Охарактеризованы тесты дифференциации иерсиний по фенотипическим признакам, а также молекулярно-биологические методы идентификации и дифференциации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Приведены факторы, осложняющие детекцию и дифференциацию типичных, атипичных, смешанных и рекомбинантных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Рассмотрены основные тесты для выявления близкородственных иерсиний в практической работе и научных исследованиях и показана необходимость их совершенствования.

Автор продемонстрировал свою эрудицию в изучаемой проблеме. Проведенный углубленный анализ литературных источников за последние 60 лет с глубиной исторической выборки вплоть до 1956 г. позволил автору отчетливо сформулировать актуальность, цель и задачи диссертационной работы.

Собственные исследования автора выполнены с использованием описанных в главе «Материалы и методы» современных микробиологических, биохимических, генетических, биологических, молекулярно-биологических, биоинформационных, иммунологических методов исследования. Всего в работе в качестве объектов исследования были использованы 270 природных и экспериментальных штаммов и 112 клоновых культур *Y. pestis*, 82 штамма *Y. pseudotuberculosis*, включающих 60 природных и 22 референтных, а также 43 клоновых и рекомбинантных культур возбудителя псевдотуберкулеза.

Знакомство с экспериментальной частью диссертации позволяет заключить, что основные результаты получены соискателем лично или при его непосредственном участии.

На первом этапе работы, результаты которой изложены в главе 3 «Сравнение эффективности регламентированных тестов для дифференциации штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*» на модели типичных и атипичных штаммов из представительной коллекции классифицирован по степени надёжности набор признаков, принятых в практике для идентификации и дифференциации этих иерсиний.

Установлено, что практически по всем регламентированным фенотипическим признакам у обоих видов иерсиний были обнаружены различные по численности группы штаммов с одинаковыми показателями (отсутствие антигена F1, плазмид, подвижности или рамнозопозитивность и т.д.). Одиночные и множественные отклонения от видоспецифического

фенотипа у обоих видов иерсиний обнаружены в пределах 2-20 % штаммов (форма колоний, чувствительность к диагностическим фагам, ферментация рамнозы, мочевины, ауксотрофность, плазмидный состав). Отмечены 4 свойства, каждое из которых обнаруживалось абсолютно у всех штаммов одного из видов. У *Y. pseudotuberculosis* все штаммы не продуцировали F1 антиген и были устойчивы к фагу Л-413 «С». У *Y. pestis* не обнаружено ни одного «подвижного» штамма, и лишённого антигена FV. Однако у противоположного вида обнаружены штаммы с подобными признаками. Это нивелировало чёткость различий и лишало исследованные маркеры полной надёжности. В отдельности, они в разной степени могли служить ориентирами, но требовали комплексного исследования по другим признакам. Точная идентификация получена со всеми штаммами только в монолокусной ПЦР с «хромосомными» праймерами «vIm12/IS216» (или «vIm33/IS1754»), специфическими для *Y. pestis* и «JS» - для *Y. pseudotuberculosis*, соответственно.

Также автором исследованы 105 клонов R- и 43 клон S-«диссоциантов», включая три клон штамма *Y. pseudotuberculosis* 3465(R) без плазмид с атипичными свойствами. Видовая принадлежность всех культур чётко определялась только с помощью рКоА с диагностикомом на антиген FV и ПЦР с видоспецифическими праймерами «vIm12/IS216» и «JS». Среди бесплазмидных клонов один был *Y. pestis*, два других - *Y. pseudotuberculosis*. Сделано заключение о смешанной культуре двух иерсиний. Идентифицирован ранее спорный штамм *Y. pestis* ЖБР-19, много лет назад представленный как «новообразованный» после действия чумного диагностического фага из бактерий «X», который фенотипически мало отличался от изменённых вариантов *Y. pestis*, но по результатам ПЦР идентифицировался как *Y. pseudotuberculosis*. Кроме того, атипичный Glp+китайский вариант вакцинного океанического штамма *Y. pestis* EV487 при клоновом анализе идентифицирован как смесь двух иерсиний.

В главе 4 «Подходы к детекции и идентификации смешанных культур возбудителей чумы и псевдотуберкулёза» автор показала, что применение дипраймерной ПЦР на основе совместного использования в реакции праймеров «vIm12/IS216» и «JS» позволяет эффективно выявлять ДНК *Y. pestis* с разным Fra-фенотипом и *Y. pseudotuberculosis* в образцах смешанных культур, состоящих из изменённых форм чумного микроба и псевдотуберкулезного в отличие от традиционно применяемых для выявления *Y. pestis* хромосомных праймеров «За». Это свидетельствует о перспективности дальнейшего использования подобного типа дипраймерной ПЦР для детекции и идентификации *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* при смешанных иерсиниозах. Также продемонстрирована успешная дополнительная иммунологическая

идентификация по антигенам F1 и FV, соответственно, в реакции объёмной агломерации (РОА) и коаггутинации (КоА), при выполнении экспресс-детекции, выделении и анализе смешанных культур возбудителей псевдотуберкулёза и чумы с разным Fra-фенотипом. Таким образом продемонстрировано, что использование пар праймеров «vIm12/IS216» и «JS», а в дополнение к ним иммунодиагностикумов на антигены F1 и FV значительно повышает эффективность поиска и доступность анализа смешанных культур, даже в случае изменённых штаммов возбудителя чумы.

В главе 5 «Особенности свойств и детекции штаммов *Y. pestis*, не продуцирующих капсульный антиген «Фракция 1» автор предлагает усовершенствование биологического метода идентификации атипичных бесфракционных (Fra-) или дефектных по *cafI* гену штаммов *Y. pestis* путем применения для заражения монгольских песчанок, которые в отличие от белых мышей гораздо более чувствительны к изменённым штаммам возбудителя чумы и гибель от которых происходит на 3-5 сутки, что позволяет облегчить иммуно- и ПЦР-диагностику.

Также в этой главе автор продемонстрировал, что для успешной идентификации штаммов *Y. pestis* с фенотипическим проявлением дефицита антигена F1 пригодны предложенные им оригинальные альтернативные праймеры (*cafI*(alt) и *cafR*(alt) *cafA*(alt) и *cafM*(alt)) на фрагменты, структурного, регуляторного и вспомогательных *caf*-генов в *caf*-опероне, выявляя, таким образом, его интактные фрагменты и подтверждая дефектность этого оперона у штаммов чумного микроба.

В главе 6 «Исследования рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* с плазмидами возбудителя чумы» автор исследовал полученные рекомбинанты штаммов *Y. pseudotuberculosis* 1923 с плазмидами *pFra* и *pCad* из штамма *Y. pestis* EV76. Рекомбинанты чётко идентифицированы в ПЦР с «хромосомными» праймерами «JS» при отсутствии ампликонов с «чумными» праймерами «vIm12/IS216». В ПЦР с праймерами на *caf*-оперон обнаружены специфические ампликоны.

В результате проведенных исследований также отмечается, что затруднений в идентификации, возникающих при появлении межвидовых рекомбинантов с признаками плазмид чумного микроба, можно избежать, используя ПЦР с двумя парами «хромосомных» праймеров «vIm12/IS216» и «JS», соответственно, специфичных для видов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.

В заключении автор подчеркивает, что полученные данные могут быть полезным заделом при решении проблемы рекомбинантных форм родственных иерсиний, появление

которых представляется ему довольно реальным. А детальная разработка алгоритма ПЦР-диагностики таких рекомбинантных форм иерсиний будет способствовать их поиску в природе и контролю над ними.

В главе 7 «Характеристика антигенного комплекса FV *Y. pestis*» автором охарактеризован с помощью электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях образец фракции V, в результате чего установлено, что препарат содержит большое количество компонентов белковой природы. При этом содержит как мажорные, так и минорные фракции. Мажорные фракции препарата преимущественно находятся в зоне белков молекулярной массой 30 - 60 и 15-17 kDa. Иммуноблотт препарата с поликлональной мышиной сывороткой (IgM) против лизата бактерий штамма-продуцента и самого антигена обнаруживал две белковые линии в зонах расположения белков с М.м. около 25 и 35-37 кДа. В исследовании FV с помощью 2D электрофореза и иммуноблоттинга с применением МКА(Е6/Н8) и антимышиной сыворотки, меченной пероксидазой хрена, максимальный окрашенный сигнал был обнаружен в зоне, приближенной к уровню движения белков с М.м. 45 кДа и рI 5,0. Методом масс-спектрометрии показано, что белок, имеющий наибольшую иммунную активность по отношению к анти-FV идентифицируется по своей аминокислотной последовательности как фермент трансальдолаза (Tal) 35-36 кДа из одноименного семейства. С помощью программы BLAST установленный ген *tal Y. pestis* 556//106 сравнили с *tal Y. pseudotuberculosis*. Отличия затрагивали 6-9 единичных нуклеотидов (1 %) в различных фрагментах гена. Подобные вариации были у разных штаммов возбудителя псевдотуберкулеза, тогда как в *tal*-гене у анализируемых штаммов *Y. pestis* отличия не найдены, что позволяет говорить о высокой стабильности структуры трансальдолазы возбудителя чумы. Все последовательности, кодирующие трансальдолазу *Y. pestis* оказались однородны и не имели каких либо нуклеотидных замен, либо делеций за исключением одного штамма.

При анализе трансальдолаз чумы и псевдотуберкулеза, имеющих наибольшее число единичных нуклеотидных замен в генах фермента, были отобраны 3 штамма *Y. pseudotuberculosis* I, *Y. pseudotuberculosis* YPIII и *Y. pseudotuberculosis* IP 31758 гены которых отличались соответственно на 6, 6 и 9 нуклеотидов в различных локусах от последовательностей генов возбудителя чумы. Перевод нуклеотидной последовательности в аминокислотную и сравнение последовательности аминокислот показало, что у двух штаммов *Y. pseudotuberculosis* I и *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758 полностью идентичная структура



трансальдозы с трансальдозой штаммов возбудителя чумы, а у штамма *Y. pseudotuberculosis* УРШ существует одно отличие в аминокислотной последовательности в 57 положении. У различных штаммов *Y. pestis* в этом положении находится аланин, тогда как у конкретного штамма *Y. pseudotuberculosis* - треонин.

Автор отмечает, что трансальдоза участвует в катализе реакций пентозофосфатного цикла и локализация её в соответствии с этой функцией определена как внутриклеточная. Сигнального пептида при этом не выявлено. Автором этот фермент обнаружен на поверхности бактерий всех вариантов *Y. pestis* при 28 и 37 °С. Это позволяет предположить существование не охарактеризованного пути, который позволяет ферменту транспортироваться экстрацеллюлярно и закрепляться на поверхности. Благодаря чему, возможно, он может выполнять дополнительные функции, такие как адгезия, аутоагрегация и инвазия бактерий продуцента.

В конце своего диссертационного исследования автор кратко и последовательно подводит итоги всей работы в целом и обсуждает наиболее важные и интересные её положения.

Выводы диссертанта обоснованы. Список литературы включает достаточное количество работ отечественных и зарубежных исследователей.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы Арсеньевой Татьяны Евгеньевны нет. Однако, в процессе ознакомления с диссертацией и авторефератом возник ряд следующих замечаний редакционного характера:

1. в «Обзоре литературы» на стр. 22 автор характеризует возбудителя чумы как наиболее «агрессивного» представителя среди рода *Yersinia*, однако, правильнее рассматривать *Y. pestis*, в качестве наиболее опасного для человека представителя иерсиний;

2. на стр. 23 «Обзора литературы» автор пишет о клинических проявлениях псевдотуберкулеза «Для человека характерен полиморфизм клинических проявлений и нередко хроническое течение с аллергическими проявлениями». Следует заметить, что хроническое течение псевдотуберкулеза у человека встречается исключительно редко;

3. там же (2-ой абзац) автор пишет «В России природные очаги чумы расположены на Северном и Центральном Кавказе, в Калмыкских степях, Среднем и Нижнем Поволжье, на территории Волго-Уральского междуречья, Горного Алтая, Тувы, Предбайкалья и Забайкалья. Как известно, в Предбайкалье природных очагов чумы не выявлено»;

4. на стр. 24 «Обзора литературы» автор констатирует следующее «До сих пор чума остается серьезной проблемой для человечества из-за активных перемещений населения и распространения штаммов с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя». В

этом случае следует заметить, что на современном этапе проблемы, связанные с заболеваемостью чумой людей или их смертностью, в основном, определяются наличием: первое – либо эндемичных по чуме территорий, с очень низким уровнем социально-экономическими жизни местного населения и недостаточным медицинским контролем (Мадагаскар, Вьетнам, страны Африканского континента), второе — либо энзоотичных по чуме территорий с характерными этническими традициями у местного населения, например, охота на носителей чумы, разделка добычи и приготовление из нее пищи (Монголия, Китай, Горный Алтай);

5. стр. 39 в подразделе «Обзора литературы» «1.2.1.Смешанные культуры бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*», автор указывает о механизме сохранения бактерий обоих возбудителей в почвенных амёбах и их цистах ссылаясь на работу Никульшина С.В. «Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhysoides* с бактериями-возбудителями чумы и псевдотуберкулёза в эксперименте» (1992) при этом не указывая на такой важный факт, что представленные данные являются только экспериментальными;

6. стр. 78 атипичные штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* от крыс были выделены в 60-х годах прошлого века в морском порту г. Ленинграда, а не Санкт-Петербурга;

7. стр. 111 во вступительной части к подразделу 6.1 «Некоторые свойства рекомбинантных вариантов возбудителя псевдотуберкулёза с плазмидой rFga бактерий чумы и подход к их детекции» автор рассуждает о том, что «Возбудители чумы и псевдотуберкулёза одновременно циркулируя в одном природном очаге и вызывая смешанные инфекции, могут попадать в условия, способствующие их обмену плазмидами и формированию в очаге клонов *Y. pseudotuberculosis* с видоспецифическими плазмидами *Y. pestis*». В данном случае мы не можем полностью поддержать мнение автора диссертации хотя бы потому, что опираясь на известный в классической генетике феномен о том, что при введении в клетки бактерий плазмид из близкородственных им видов других бактерий при дальнейшей сегрегации плазмид в дочерние клетки происходит утрата чужих плазмид и восстановление исходного плазмидного состава как у материнских клеток. Данный феномен, возможно, является одним из механизмов обеспечения сохранения генотипа у бактерий. Также это подтверждается и тем, что на практике за весь исторический период наблюдения за природными очагами чумы не известны случаи выделения природных рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis*, содержащих плазмиды *Y. pestis*. Происхождению рекомбинантов в данном случае, скорее всего, следует рассматривать в качестве искусственного,

лабораторного достижения. Сохранение видового постоянства одна из основных «задач» всего живого в природе, что также подтверждается отсутствием наличия каких-либо естественных переходных форм;

8. на стр. 120 автор пишет, что «возможность передачи «чумных» плазмид и экспрессии диагностических плазмидных генов доказана у разных видов патогенных и условно патогенных бактерий сем. *Enterobacteriaceae*» ссылаясь на руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко - М., - 2009. - 472 с.. Однако, в данном руководстве такие сведения не приводятся;

9. стр. 140 в разделе «Заключение» желательнее более подробно разъяснить фразу «Этот факт служит помехой анализу подобных «спорных» штаммов и особенно культур, содержащих примесь бактерий псевдотуберкулёза, и может в значительной степени затруднять исследование «пульсирующих» природных очагов», поскольку не ясно, что в данном случае автор квалифицирует под формулировкой пульсирующие очаги;

10. В разделе автореферата ... стр. 4-5 у автора приводится ссылка на монографию Апарина и Голубинского, однако, в 1989 г. в данной работе этими авторами не рассматривался неосновной подвид чумного микроба в качестве *subsp. microtus*, а имела место характеристика свойств и особенностей неосновных подвидов *Y. pestis*: алтайского, улэгейского, гиссарского и кавказского;

Также, во время рассмотрения диссертации возник вопрос для обсуждения «Планируется ли в перспективе создание тест-системы с праймерами vlm12/JS216 для практического использования при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы?».

**Соответствие автореферата основным положениям диссертации.** Автореферат оформлен в соответствии с требованиями стандарта, а его содержание полностью соответствует основным положениям диссертации и дает полное представления о проделанной работе.

**Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.** По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из них семь в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ .

**Заключение.** Таким образом, диссертация Арсеньевой Татьяны Евгеньевны является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с совершенствованием диагностики возбудителей чумы и псевдотуберкулёза и контроля над ними.

Основные результаты исследования получены лично автором и выполнены на современном методическом уровне. Полученные материалы репрезентативны, статистически обработаны, тщательно проанализированы, что обеспечило объективность выдвинутых положений и выводов. Выводы, сформулированные автором, обоснованы, подтверждены достоверным материалом, логически вытекают из содержания работы, отражают объем экспериментальных исследований и их уровень.

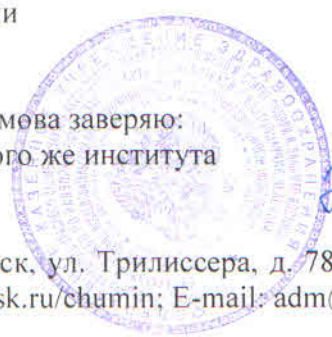
В целом, по актуальности исследований, уровню и адекватности методических приемов, объему и качеству выполненных экспериментов, научной новизне, практической значимости диссертационная работа Арсеньевой Татьяны Евгеньевны «Эффективные приёмы видовой идентификации атипичных штаммов возбудителей чумы, псевдотуберкулёза и их рекомбинантов» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, а её автор Арсеньева Татьяна Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв на диссертацию обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора», протокол № 8 от 30 августа 2017 г.

Шестопалов Михаил Юрьевич  
кандидат медицинских наук, заведующий отделом микробиологии чумы  
Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский  
ордена Трудового Красного Знамени научно-  
исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека

Климов Валерий Тимофеевич  
кандидат медицинских наук, старший  
научный сотрудник отдела эпидемиологии  
того же института

Подписи М. Ю. Шестопалова и В. Т. Климова заверяю:  
Начальник отдела кадров и спецчасти того же института  
Шангареева Наталья Ильинична



664047, Иркутская область, г. Иркутск, ул. Трилиссера, д. 78; Телефон: +7(3952) 22-01-39;  
Факс: +7(3952) 22-01-40; <http://www.irkutsk.ru/chumin>; E-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)