

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Арсеньевой Татьяны Евгеньевны, на тему «Эффективные приемы видовой идентификации атипичных штаммов возбудителей чумы, псевдотуберкулеза и их рекомбинантов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Вопросы обнаружения и идентификации штаммов возбудителя чумы существуют с давних времен. Известно, что в природных очагах на разных стадиях эпизоотий встречаются атипичные варианты (бесплазмидные, бесфракционные, фагоустойчивые) штаммов чумного микроба. Используемые бактериологические и иммунологические методы обнаружения изменённых штаммов *Y. pestis* не достаточно надёжны, а нередко и трудоёмки. Ситуация значительно осложняется в случаях одновременной циркуляции чумного и псевдотуберкулезного микробов, так как имеется высокая гомология по фенотипическим и генетическим свойствам.

В связи с этим, поиск новых видоспецифических антигенов чумного микроба, стабильно сохраняющихся при всех видах изменчивости, является своевременным. В последние годы многие исследователи проявляют интерес к разработке методов идентификации *Y. pestis* не только на основе общепризнанного антигена F1, но и других, в том числе, антигена FV. С развитием молекулярно-генетических технологий разработки более высокочувствительные и точные методы (ПЦР-диагностика и др.) по сравнению с традиционными и рутинными тестами. Вместе с тем, не снимается необходимость выяснения молекулярных механизмов изменчивости генов, определения их значимости для сохранения возбудителя чумы в природе и решения вопроса о реверсibilidade этих изменений.

Несомненный интерес представляет получение новых данных о полиморфизме возбудителей чумы и псевдотуберкулёза и подборе альтернативных молекулярных мишеней для их дифференциации, а также определении их диагностической ценности с практической точки зрения. Учитывая вышеизложенное, разработка новых методических подходов к решению обозначенной в представленной работе проблемы, представляется актуальной.

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 7 глав собственных исследований, заключение, выводы, список литературы, состоящий из 350 источников, из которых 143 – зарубежные. Объем

диссертации составляет 223 страницы машинописного текста, содержит 13 таблиц и 28 рисунков.

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований; приведены научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые в составе антигенного комплекса фракции V чумного микроба идентифицирован иммунодоминантный фермент адгезин трансальдолаза (Tal) и подтверждена высокая стабильность генетической структуры *tal*-гена *Y. pestis* при изучении нуклеотидной последовательности генов исследованных штаммов.

Показано, что у рекомбинантных штаммов *Y. pseudotuberculosis* при приобретении плазмиды pFga чумного микроба в больших дозах усиливаются патогенные свойства, что выражается в неблагоприятном воздействии на макрофаги лабораторных животных. При этом отмечено, что в малых дозах штаммы защищают белых мышей от возбудителя чумы.

Научная новизна подтверждена Патентом на изобретение № 2422535. (Приоритет 11.01.2010) «Способ идентификации штаммов вида *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*».

В литературном обзоре (Глава I) в достаточном объеме представлены сведения по характеристике чумного и псевдотуберкулезного микробов, кратко - о путях их эволюции и вызываемых ими заболеваниях. Проанализированы литературные источники, содержащие информацию об основных фенотипических признаках, по которым традиционно проводится идентификация чумного микроба и дифференциация от возбудителя псевдотуберкулеза. Следует отметить, что подробно освещены данные о молекулярно-генетических методах, в том числе ПЦР-анализе в разных его вариантах, широко применяющихся не только для идентификации и межвидовой дифференциации возбудителей, но и позволяющие исследовать наличие и структуру генов, проверять степень их варибельности, а также контролировать перемещение генов между различными бактериями.

Анализ литературных данных позволил соискателю обосновать необходимость научного подхода для решения поставленных задач, получения новых сведений о полиморфизме возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, а также оценить возможность их практического использования при идентификации и дифференциации *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.

В главе 2 «Объекты, материалы и методы исследования» изложены методические приемы, с помощью которых были решены поставленные задачи. Работа выполнена на представительном материале, при этом объектами

исследования служили штаммы *Y. pestis*, в том числе вирулентные; природные, референтные и рекомбинантные штаммы *Y. pseudotuberculosis*. Следует отметить высокий уровень методических подходов с использованием микробиологических, иммунохимических, иммунобиологических, молекулярно-генетических и статистических методов, что свидетельствует о высоком профессионализме соискателя. Объем фактического материала является достаточным для проведения статистической обработки результатов.

В главе 3 «Сравнение эффективности регламентированных тестов для дифференциации штаммов *Y. pestis* и *Y. Pseudotuberculosis*» представлены результаты, касающиеся изучения варибельности диагностических признаков идентификации типичных и атипичных штаммов *Y. pestis* и их дифференциации от *Y. pseudotuberculosis*. В ходе исследования определены культурально-морфологические, биохимические, фаголизабельные и генетические свойства 270 штаммов *Y. pestis* (subsp. *pestis*), из различных природных очагов и хранившиеся в РостНИПЧИ, 60 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, включая природные и рекомбинантные штаммы; а также 20 штаммов *Y. pseudotuberculosis* 16 серотипов (Институт им. Макса фон Петтенкофера, Мюнхен, Германия).

В ходе проведенных исследований автор показала, что принадлежность изученных штаммов до видов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* была подтверждена только с помощью двух тестов - при проведении монолокусной ПЦР с видоспецифическими праймерами группы «vIm» и «JS», комплементарными нуклеотидной последовательности генам фрагментов хромосомы, и с экспериментальным диагностикумом чумным иммуноглобулиновым коаггулинирующим для обнаружения антигена FV *Y. pestis* в реакции коаггутинации (pKoA).

Анализируя полученные данные, автор отметила, что в острый период инфекции от больных людей и чувствительных животных, как правило, выделялись штаммы чумного микроба гомологичные по фенотипическим признакам. Однако сложности возникали при идентификации выделенных штаммов *Y. pestis* Fra<sup>-</sup>, скрининге штаммов в межэпизоотический период, а также при исследовании длительно хранящихся штаммов. Варибельность штаммов *Y. pseudotuberculosis* обнаруживалась при исследовании биологического материала и объектов внешней среды.

Результаты проведенных исследований на модели подобранной Татьяной Евгеньевной коллекции атипичных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* показали возможность использования комплексного подхода для идентификации и дифференциации иерсиний в ПЦР-анализе на основе разработанных

специфических видовых паймерах группы «vIm» и в рКоА с диагностикумом чумным иммуноглобулиновым коаггулинирующим для обнаружения антигена FV *Y. pestis*.

В Главе 4 «Подходы к детекции и идентификации смешанных культур возбудителей чумы и псевдотуберкулёза» продемонстрированы этапы работы, касающиеся определения диагностической ценности предложенного комплексного подхода, совмещающего как ПЦР-анализ с использованием специфичных праймеров «vIm12/IS» и «JS» для одного из видов иерсиний, так и идентификацию различных штаммов *Y. pestis* серологическим методом по антигенам F1 и FV.

Необходимо подчеркнуть целенаправленный подход соискателя при выполнении поставленной задачи. Татьяна Евгеньевна, моделируя проведение эксперимента в смешанных культурах для дифференциации иерсиний и идентификации чумного микроба, последовательно вначале в ПЦР анализе со специфичными для каждого вида иерсиний праймерами, подтвердила возможность дифференциации *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Следующим этапом работы было изучение культур, выращенных при температурах 28 и 37 °С, на наличие специфических для возбудителя чумы капсульного антигена F1 в реакции объёмной агломерации (РОА) и продуцируемого независимо от наличия капсулы и других форм изменчивости антигена FV в рКоА.

Несомненный интерес вызывают полученные данные, свидетельствующие о значительном повышении эффективности анализа в смешанных культурах типичных и изменённых штаммов *Y. pestis* при использовании комплексного подхода видовых специфических праймеров «vIm12/IS216», «JS» и иммуноглобулиновых диагностикумов для обнаружения антигенов F1 и FV.

В главах 5 и 6 «Особенности свойств и детекции штаммов *Y. pestis*, не продуцирующих капсульный антиген «фракция 1» и «Исследования рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* с плазмидами возбудителя чумы» посвящены работе, направленной на изучение свойств штаммов *Y. pestis* Fra<sup>-</sup> и рекомбинантных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, а также поиска новых подходов совершенствования их идентификацию и дифференциацию.

Важным этапом работы является изучение основных свойств антигена FV *Y. pestis*. Полученные результаты позволили автору сделать заключение о том, что антиген FV не содержит структурных компонентов, свидетельствующих о его секреции вне клетки и расположении экстрацеллюлярно в связанном состоянии с цитоплазматической или клеточной мембранами. Положительная рНИМФ с МКА подтверждает специфическую связь МКА (гибридома Е6/Н8) с поверхностно расположенной трансальдозой у штаммов, выращенных при температурах как

28 °С, так и при 37 °С, что позволяет выявлять антиген FV при идентификации *Y. pestis* и дифференциации от *Y. pseudotuberculosis*.

В заключении диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая значимости полученных результатов. Логическим завершением проделанной работы явилось заключение Татьяны Евгеньевны о том, что предложенный ее комплексный подход, поможет решить проблемы измененных и рекомбинантных форм родственных иерсиний, а детальная разработка алгоритма ПЦР-диагностики идентификации и дифференциации иерсиний, будет способствовать их поиску в природе, мониторингу за ними и своевременному проведению противоэпидемических мероприятий

Работа имеет большой практический выход. Разработаны и утверждены на учрежденческом уровне «Методические рекомендации по применению полимеразной цепной реакции при видовой идентификации и внутривидовой дифференциации бактерий вида *Y. pestis*» (Протокол № 10 от 28.08.2008); «Методические рекомендации по анализу и диагностике микстов возбудителей чумы и псевдотуберкулёза» (Протокол №14 от 18.12.2009); «Методические рекомендации по индикации возбудителей *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* в органах биопробных животных» (Протокол № 16 от 22.12.2010); «Методические рекомендации по получению антигенного комплекса «фракция V» чумного микроба» (Протокол №2 от 17.12.2015). Материалы диссертации включены в курс лекций по ООИ для врачей-бактериологов при РостНИПЧИ (Акт внедрения от 07.11.15).

Материалы диссертации доложены на Межгосударственных и Всероссийских научно-практических конференциях, на международных, в том числе симпозиуме (США, Кентукки, 2006) и научной конференции (Германия, Мюнхен, 2011).

Материалы исследований отражены в автореферате и 21 печатной работе, из которых 5 статей опубликованы в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ Министерства образования и науки, 2 статьи в электронном журнале «Univsum: химия и биология», 13 публикаций в сборниках, трудах и материалах Всероссийских и международных научных конференций.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах.

Общее впечатление о работе положительное. Автором представлена информация, позволяющая получить новые сведения, касающиеся антигена FV *Y. pestis* и продемонстрирована возможность его определения у измененных штаммов, циркулирующих в природных очагах. Вместе с тем в литературном

обзоре приводятся многочисленные ссылки на источники ранних 1970-90-х годов, особенно, по изучению антигена FV. Желательно было бы приводить ссылки на более поздние источники литературы.

Следует отметить, что полученные новые сведения, касающиеся определения серологическим методом штаммов *Y. pestis*, в том числе и дефектных по тому или иному признаку, подтверждают решение этой задачи. Однако чумной диагностикум для рКоА при идентификации и дифференциации выделенных штаммов иерсиний может потерять свою актуальность, так как использование диагностических препаратов практическими учреждениями возможно только после их регистрации в установленном порядке. Ваше видение по этому вопросу?

К сожалению, после глав отсутствуют заключения, свидетельствующие о том или ином значении проделанной работы. Наметки на это есть, но они достаточно размыты и приходится выискивать наиболее значимые положения.

Ссылку на Патент изобретения № 2422535 следует отражать в разделе «Научная новизна», а не в «Теоретическая и практическая значимость».

По тексту допускается вольное трактование терминов, употребляемых в обиходе, но не допустимых в научной работе, в названии праймеров, генов, препаратов и т.д. Не приведено общепринятое название диагностикума для рКоА, по тексту встречается название одного и того же препарата, генов, действия по разному обозначенных или интерпретированных. Встречается употребление «сленга» в изложении постановки методов или трактовки результатов, что также усложняет чтение диссертации. Имеются погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, общие замечания по оформлению обозначений, технические опечатки. Нет четкого представления о количестве штаммов использованных в работе, так как имеется не соответствия на стр. 16, 52, 68.

Вместе с тем, все сделанные замечания и рекомендации не влияют на положительную оценку работы.

Таким образом, работа Арсеньевой Т.Е. на тему «Эффективные приемы видовой идентификации атипичных штаммов возбудителей чумы, псевдотуберкулеза и их рекомбинантов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченным самостоятельным исследованием, в котором решена задача методологического подхода выявления и дифференцирования различных атипичных штаммов иерсиний, в чистых, смешанных культурах и в органах биопробных животных, что имеет важное научно-практическое значение для микробиологии особо опасных инфекций. По актуальности, объему, новизне, и практической значимости полученных результатов диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.),

предъявляемым к диссертациям, а ее автор заслуживает присуждению степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 микробиология.

Официальный оппонент

Главный эксперт  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Научный центр  
экспертизы средств медицинского  
применения» Минздрава России,  
доктор медицинских наук,  
старший научный сотрудник

Саяпина Л.В.

Юридический адрес:  
127051, г. Москва,  
Петровский бульвар, д.8, строение 2  
Тел: 499-241-91-47,  
E-mail: Sayapina@exrmed.ru

Подпись д.м.н. Саяпиной Л.В. удостоверяю:

Начальник отдела подготовки кадров  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Макаров А.В.