

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Шишкиной Лидии Александровны, на тему «Влияние полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* на иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертации

У человека вспышки чумы вызывают штаммы *Y. pestis* подвида *pestis*. В последние годы в природных очагах полевого типа циркулируют штаммы, выделенные в биовар *microti*. Представители подвида *microti* являются эндемичными для популяций некоторых видов полевок и могут вызывать спорадические заболевания. Штаммы обоих подвидов образуют белковую капсулу, кодируемую генами *cafI* оперона. Несомненный интерес представляет получение новых данных о полиморфизме структурного гена *cafI* *Y. pestis*, а также перекрестной активности различных изоформ капсульного антигена у представителей различных подвидов чумного микроба. До настоящего времени не в полной мере известны возможности диагностических наборов реагентов и тест-систем выявлять атипичные штаммы чумного микроба, продуцирующие различные изоформы белка CafI. Учитывая вышеизложенное работа, проводимая в этом направлении, является актуальной.

Степень обоснованности научных исследований, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Шишкиной Л.А. является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены новые сведения о распространенности и степени полиморфизма капсульного антигена *Y. pestis*, показаны возможности выявления атипичных штаммов чумного микроба, дана оценка напряженности перекрестного иммунитета. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах.

В работе четко обоснованы актуальность исследований; научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования.

В автореферате диссертационной работы Шишкиной Л.А. представлены положения, выносимые на защиту, выводы, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимости, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Высокая степень достоверности и обоснованности полученных данных и выводов диссертации не вызывает сомнения и показывает правильность выбора методических подходов. Степень достоверности полученных данных основана на

использовании большого фактического материала, с использованием современных методов исследования.

Получены новые данные о том, что штаммы подвида *microti* биоваров *altaica*, *qinghaiensis*, *hissarica*, *talassica* и *ulegeica* содержат глобальный тип белка CafI_{NT1} (A48 F117). Впервые обнаружен тип CafI_{NT3} (A48 V117), эндемичный для штаммов Дагестанского высокогорного природного очага чумы (№ 39). Новыми являются сведения о получении полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов bv. *caucasica* из Дагестанского высокогорного природного очага чумы, а также изолятов bv. *hissarica*, *talassica* и *ulegeica*.

Требованиям научной новизны отвечают исследования о способности индуцировать напряженный перекрёстный иммунный ответ тремя изоформами CafI_{NT1}, CafI_{NT2} и CafI_{NT3} *Y. pestis*. Установлено, что иммунизация изоформой CafI_{NT1} обеспечивала лучшую защиту от всех трех вариантов штаммов *Y. pestis*.

Работа выполнена в рамках проекта Российского Научного Фонда № 14-15-00599 «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочных штаммов *Yersinia pestis*» и НИР «Совершенствование нормативно-методической базы процедуры депонирования штаммов патогенных микроорганизмов, клеточных культур и результатов их исследований в государственных коллекциях Роспотребнадзора по государственному контракту № 12-д».

Содержание диссертации, ее завершенность

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований; приведены научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Четыре поставленные задачи соответствуют цели работы и положениям, выносимым на защиту.

В литературном обзоре (Глава I) в достаточном объеме представлены сведения о возбудителе чумы, капсульном антигене F1, молекулярной структуре и генетических детерминантах CafI *Y. pestis*, а также о шаперон/ашероной системе секреции чумного микроба. Проанализированы литературные источники о способах выделения и о роли капсульного антигена F1 в патогенезе и формировании устойчивости к чумной инфекции, а также содержащие информацию об иммуногенных и генетических свойствах CafI *Y. pestis*.

Анализ литературных данных позволил соискателю обосновать необходимость научного подхода для решения поставленных задач о распространенности и степени полиморфизма капсульного антигена у чумного микроба, эффективности индикации штаммов с атипичными изоформами F1 с помощью коммерческих тест-систем и оценить напряженность перекрестного иммунитета.

В главе 2 «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых были решены поставленные задачи. Работа выполнена на представительном материале, при этом объектами исследования служили 125 штаммов бактерий, в том числе *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. pestis* subsp. *pestis*, и *Y. pestis* subsp. *microti*. Следует отметить высокий уровень методических подходов с использованием микробиологических, биохимических, биологических, иммунологических, молекулярно-генетических, статистических методов и математического моделирования, что свидетельствует о высоком профессионализме соискателя. Объем фактического материала является достаточным для проведения статистической обработки результатов.

В главе 3 «Сравнение молекулярно-генетических, физико-химических и структурно-пространственных свойств изоформ CafI, выявление отличий» представлены результаты изучения полиморфизма последовательностей гена *cafI* у 122 штаммов *Y. pestis* подвида *microti*, относящихся к биоварам *caucasica*, *hissarica*, *talassica*, *altaica*, *xilingolensis*, *qinghaiensis* и *ulegeica* и соответствующих полипептидов у представителей различных подвидов *Y. pestis*, выделенных на территории природных очагов чумы СНГ и Монголии.

В своих исследованиях Лидия Александровна показала, что белок CafI *Y. pestis* образует три изоформы, отличающиеся структурой, а именно, глобальный тип NT1 (A48 F117); свойственный штаммам из Закавказского высокогорного и граничащего с ним Приараксинского низкогорного природных очагов тип NT2 (S48 F117) и впервые обнаруженный тип NT3 (A48 V117), эндемичный для представителей Восточно-Кавказского (республика Дагестан) высокогорного природного очага чумы.

Проведенное секвенирование капсульного антигена и сравнительное изучение вариабельности аминокислотных нуклеотидных последовательностей *cafI* соответствующих полипептидов у различных подвидов *Y. pestis* показало, что замены A48→S48 и F117→V117, найденные в изоформах CafI_{NT2} и CafI_{NT3}, вызывают изменение упорядоченности. Анализируя полученные данные, автор обнаружила, что аминокислотные замены, найденные в структуре CafI (A48 → S48 в CafI_{NT2} и F117 → V117 в CafI_{NT3}), вызывали увеличение склонности к внутренней неупорядоченности в местах коротких регионов.

Результаты проведенных исследований на основании компьютерного моделирования подтвердили увеличение склонности к местной внутренней неупорядоченности в коротких регионах белка, окружающих аминокислотные замены A48→S48 в CafI_{NT2} и F117→V117 в CafI_{NT3}.

Вышеизложенное позволило автору сделать заключение о том, что все три изоформы капсульного антигена чумного микроба имеют молекулярно-генетические, структурно-пространственные и физико-химические отличия.

В главе 4 «Изучение иммуногенной активности трёх изоформ CafI *Y. pestis*» продемонстрированы этапы работы, касающиеся оценки перекрестной серологической активности и протективности изоформ CafI. Определение перекрёстной серологической активности трех изоформ CafI *Y. pestis* (CafI_{NT1}, CafI_{NT2} и CafI_{NT3}) с помощью тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной «ИФАПестФ1-М» и набора реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ-тест *Yersinia pestis*» выявило способность сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных CafI_{NT1}, CafI_{NT2} и CafI_{NT3}, перекрестно взаимодействовать с тремя изоформами CafI *Y. pestis*. Показано, что титры анти-CafI антител, определённые методом ИФА, были в 4–7 раз выше у животных, иммунизированных CafI_{NT1}, при иммунизации изоформой CafI_{NT3} титр антител был самым низким.

Следует подчеркнуть целенаправленный подход соискателя при выполнении поставленных задач. На следующем этапе Лидия Александровна убедительно продемонстрировала наличие перекрестного иммунитета у экспериментальных животных при иммунизации тремя изоформами CafI. При этом иммунизация изоформой CafI_{NT1} обеспечивала лучшую защиту от всех трех вариантов штаммов *Y. pestis*. Индексы иммунитета после вакцинации двумя другими изоформами

Caf1NT2 и Caf1NT3 и заражения штаммами *Y. pestis* C-376 и C-824 были значительно ниже. Полученные результаты принципиально важны с точки зрения биологической безопасности, так как позволяет сделать прогноз об эффективности иммунитета, индуцированного изоформой Caf1NT1, при заражении штаммами с изоформами Caf1NT2 и Caf1NT3.

На основании результатов (Глава 5), посвященных изучению полиморфизма нуклеотидных последовательностей шаперон/ашерных систем секреции *Y. pestis*, автор установила, что из десяти систем секреции IV типа чумного микроба полиморфизм аминокислотных последовательностей, входящих в их состав белков, свойственен пяти ашерам, трем молекулярным шаперонам и трем субъединицам пилевых адгезинов. Показано, что у двух наиболее функционально значимых систем секреции капсульного и рН 6 антигенов последовательности белков ашеров и шаперонов консервативны. Вместе с тем при идентификации штаммов *Y. pestis*, в том числе при определении их биоваров, в качестве дополнительных диагностических критериев принадлежности к разным внутривидовым группам Лидия Александровна рекомендует использовать выявленный полиморфизм Caf1 и других компонентов ШАСС.

Несомненный интерес представляют проведение полногеномного секвенирования 19 штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* шести биоваров: *ulegeica*, *caucasica*, *xilingolensis*, *hissarica*, *talassica*, *altaica*, депонированных в DDBJ/EMBL/GenBank.

В заключение диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая значимости полученных результатов. Логическим завершением проделанной работы явилось заключение Шишкиной Л.А. о том, что выявленный в ходе полногеномного секвенирования и сравнительного анализа полиморфизм генов, кодирующих компоненты систем секреции IV типа, специфический для филогенетических групп чумного микроба, может быть использован для идентификации и определения биоварной принадлежности изолятов *Y. pestis*.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Работа имеет большой теоретический и практический выходы. Определена степень популяционной изменчивости капсульного антигена в основных внутривидовых филогенетических группах чумного микроба. Выявлено различие в поведении Caf1_{NT3} изоформы во время гидрофобной хроматографии: элюирование Caf1_{NT3} распределялось между 600 мМ и 50 мМ градиента сульфата аммония (СА), в то время как Caf1_{NT1} и Caf1_{NT2} изоформы достигали максимума в 350 мМ при тех же условиях элюирования. Полученные результаты проведенных исследований подтвердили, что коммерческие диагностические препараты способны обеспечить эффективную индикацию/идентификацию возбудителя чумы. Показано, что вакцина чумная живая при введении лабораторным животным, обеспечивает напряженный иммунитет в отношении различных штаммов *Y. pestis*, независимо от изоформы их капсульного антигена.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы штаммы *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *Caucasica* C-376pCad⁻ и C-824pCad⁻ - продуценты капсульного антигена чумного микроба изоформ Caf1_{NT2} и Caf1_{NT3} (федеральный уровень внедрения).

Полногеномные последовательности 19 штаммов *Y. pestis* депонированы в базе данных GenBank с присвоением кодов доступа.

Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на семи Всероссийских и международных научно-практических конференциях и II-м Национальном конгрессе бактериологов.

Материалы диссертации используются в лекциях на курсах подготовки кадров, для слушателей профессиональной переподготовки и повышения квалификации.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключение, выводы, список литературы, включающий 29 работ отечественных и 156 работ зарубежных авторов. Объем диссертации составляет 163 страницы машинописного текста. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 10 таблицами, включая 3 приложения.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.

Основные результаты диссертационной работы получены при личном участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями. Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических исследованиях, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе 7 статей в международных реферируемых научных журналах и 5 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в восьми выводах.

Диссертационная работа производит положительное впечатление. Принципиальных замечаний по работе нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, не влияют на высокую положительную оценку работы.

Лидия Александровна, в свете полученных результатов, на ваш взгляд, в каком направлении, прежде всего, следует разрабатывать высокочувствительные диагностические препараты (иммуно-химические, молекулярно-генетические или др.) для индикации/идентификации атипичных штаммов *Y. pestis*? Какие есть предложения в плане подходов к разработке новых безопасных и эффективных вакцин, обеспечивающих развитие более продолжительного противочумного иммунитета по сравнению с живой вакциной?

Заключение

Диссертационная работа Шишкиной Л.А. на тему «Влияние полиморфизма капсульного антигена *Yersinia pestis* на иммунодиагностику и вакцинопрофилактику чумы», является законченным самостоятельным исследованием, в котором получены новые сведения о распространенности и степени полиморфизма капсульного антигена *Y. pestis*, оценки выявления атипичных штаммов чумного микроба и напряженности перекрестного

иммунитета, 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 ученой 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@expmed.ru

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

Начальник отдела подготовки кадров
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Макаров А.В.