

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию КАРИМОВОЙ Татьяны Викторовны «Энтеропатогенные иерсинии: микробиологический мониторинг, молекулярно-биологические особенности, алгоритм лабораторной диагностики», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования. Энтеропатогенные иерсинии – *Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* являются возбудителями гастроэнтеритов различной степени тяжести. Во многих странах мира периодически наблюдают крупные эпидемические осложнения псевдотуберкулеза. Для кишечного иерсиниоза отмечено проявление в виде спорадических случаев, хотя описано и несколько эпидемических вспышек этой болезни. В России эти болезни регистрируют практически повсеместно, однако наиболее высокие показатели заболеваемости отмечены в Сибирском, Северо-Западном и Дальневосточном федеральных округах.

Используемые методы диагностики энтеропатогенных иерсиний основаны на классических приемах лабораторных исследований и не отвечают современным требованиям. Поэтому, несомненно, актуальной является разработка принципов и алгоритма диагностических исследований этих возбудителей в соответствии с требованиями Национальной системы индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней. Важно также изучение особенностей возбудителей, циркулирующих на конкретных территориях, что может стать основой мониторинга возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза.

До настоящего времени не была определена тактика лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии с учетом многоуровневой системы мониторинга возбудителей инфекционных болезней в РФ, отсутствовали нормативно-методические документы, регламентирующие порядок организации и проведения таких исследований.

Все вышесказанное свидетельствует об актуальности выполненного диссертационного исследования.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Исследования Каримовой Т.В. выполнены на современном научно-методическом уровне. В результате теоретического анализа большого объема литературных данных был убедительно обоснован выбор направления исследований диссертанта. Четко сформулирована цель исследования. Задачи вытекают из поставленной цели работы, компактно и последовательно отражают решение поставленных в диссертации вопросов.

Экспериментальные исследования проведены с использованием комплекса классических (микробиологических, иммунологических) и современных молекулярных методов. Использовано аналитическое высокотехнологичное оборудование. Степень достоверности выполненных исследований подтверждена с помощью методов вариационной статистики. Разнообразие использованных методов свиде-

тelleствует о высоком уровне профессиональной подготовки автора, обеспечившем получение и объективную оценку результатов экспериментов.

Три положения, выносимые на защиту, и семь основных выводов, приведенных в диссертации, обоснованы, достоверны и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

Научная новизна диссертационной работы несомненна. Автором оптимизирована схема микробиологического мониторинга энтеропатогенных иерсиний. Сформулированы принципы, предложен порядок организации и проведения лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии в лабораториях различного уровня. Проведено комплексное исследование свойств представительной выборки штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, циркулирующих в Сибири и на Дальнем Востоке. Идентифицированы два новых для Российской Федерации вида – *Y. mollaretii* и *Y. bercovieri*. В результате исследования диких мигрирующих птиц были подтверждена их роль как природного резервуара этих возбудителей. Полученные результаты, несомненно, можно считать приоритетными, что свидетельствует о безусловной новизне исследования.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования.

На основании результатов исследования подготовлены и используются в практической деятельности учреждений здравоохранения нормативно-методические документы федерального уровня – Санитарные правила «Профилактика иерсиниозов» (утверждены Постановлением руководителя Роспотребнадзора № 37 от 26.04.2010 г.) и Методические указания «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях» (утверждены руководителем Роспотребнадзора 18.06.2012 г.).

Разработана структура пополняемой базы данных «Штаммы *Yersinia pseudotuberculosis*, изолированные в Сибири и на Дальнем Востоке» (Свидетельство о регистрации базы данных № 2012620381 от 25.04.2012).

Депонированы в различных Государственных коллекциях три штамма иерсиний, в том числе штаммы *Y. mollaretii* и *Y. bercovieri*, ранее в России не выявленные.

Результаты исследования включены в курс лекций дополнительного послевузовского образования при Иркутском противочумном институте.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.

Работа выполнена автором в отделе микробиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора в рамках двух плановых тем НИР. Автор принимал непосредственное участие в анализе современной литературы по теме диссертации, обсуждении цели исследования, планировании наиболее эффективных путей для решения поставленных задач, выполнении исследований и статистической обработке экспериментальных данных. Штаммы, изученные в работе, изолированы лично автором при проведении мониторинговых исследований на различных территориях Сибири и Дальнего Востока. Депонирование штаммов *Yersinia*, опубликование статей и тезисов докладов выполнено в соавторстве с другими сотрудниками Иркутского противочумного института и института Пастера (Франция).

Апробация работы, публикации.

Результаты диссертационного исследования Каримовой Т.В. прошли серьезную апробацию. По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 7 статей, опубликованных в журналах из перечня ВАК и индексируемых в Web

of Science, четыре работы – в зарубежной печати. Материалы диссертации обсуждены на конференциях Российского и международного рангов.

Общая характеристика содержания диссертации.

Диссертация построена по традиционному плану и оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к рукописям диссертаций. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, главы «Материалы и методы», трех глав собственных исследований, заключения и выводов. Объем диссертации – 163 страницы машинописного текста. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 27 таблицами. Список литературы включает 66 работ отечественных и 179 иностранных авторов. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям текста диссертации.

Во введении обоснована актуальность выбранного направления, сформулированы цель и задачи исследования, новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор литературы. В ней представлен анализ современных публикаций отечественных и зарубежных исследователей, посвященных характеристике и таксономии бактерий рода *Yersinia*, основным факторам патогенности возбудителей и некоторым аспектам патогенеза, распространенности и лабораторной диагностике энтеропатогенных иерсиний. Обзор литературы написан в хорошем стиле и дает возможность составить достаточно полное представление о перспективности направления собственных исследований.

Глава 2 «Материалы и методы». Представлены сведения об использованных микробиологических, молекулярно-биологических, иммунологических, статистических методах. Внушительный объем проведенных исследований, который включал исследование 13813 проб из различных источников, при этом было выделено 305 культур иерсиний различных видов; изучены биологические свойства 225 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 345 изолятов *Y. enterocolitica*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке. Все исследования выполнены на современном оборудовании с использованием сертифицированных тест-систем.

Глава 3 посвящена совершенствованию микробиологического мониторинга *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* на основе применения молекулярно-генетических методов исследования.

В работе были проанализированы такие показатели как количество исследований на *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в изучаемом регионе, результативность различных методов, структура исследований.

Полученные результаты дали автору основание для предложения унифицированной схемы лабораторного исследования на патогенные иерсинии, которая включает как классические (микробиологические), так и молекулярные (ПЦР, MALDI-ToF MS) методы анализа. Предложенная схема была апробирована в 2010-2015 гг. при исследовании материала из различных источников и разных территорий Сибирского и Дальневосточного ФО. Выделено 305 культур иерсиний: 92 – *Y. pseudotuberculosis* и 197 – *Y. enterocolitica*.

Проведенное изучение циркуляции энтеропатогенных иерсиний среди перелетных и мигрирующих птиц в Новосибирской области позволило автору впервые выделить *Y. pseudotuberculosis* и патогенную *Y. enterocolitica* от мигрирующих птиц. Также впервые установлен факт выделения культуры патогенной *Y. enterocolitica* с тушек птиц.

При проведении лабораторных исследований на вспышках псевдотуберкулеза в различных областях Сибирского и Дальневосточного округов была подтверждена результативность метода ПЦР. Для установления родства выделенных штаммов впервые были использованы методы VNTR-анализа и пульс-электрофореза (PFGE), видоспецифичность выделенных культур подтверждали методом масс-спектрометрии.

Глава 4 посвящена изучению фенотипических и молекулярно-генетических свойств *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке. На представительной выборке штаммов *Y. pseudotuberculosis* показана генетическая неоднородность фенотипически гомогенных изолятов. Выделены четыре геногруппы, различающиеся по плазмидному составу, наличию или отсутствию генов суперантигена и «острова патогенности».

При идентификации штаммов *Y. enterocolitica* установлена их принадлежность к определенному серотипу и биотипу, изучено наличие хромосомных генов вирулентности *ail*, *ystA* и *ystB* и плазмиды вирулентности pYV. Для штаммов с нечеткими фенотипическими характеристиками видовая принадлежность была определена с помощью MALDI-ToF и ПЦР. В результате проведенного фаготипирования выявлено наличие штаммов с уникальным для России фаготипом. Автору удалось идентифицировать два новых для РФ вида – *Y. mollaretii* и *Y. bercovieri*.

Глава 5 имеет несомненное практическое значение. В ней предложен разработанный автором алгоритм трехуровневой системы лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии.

Определены основные принципы организации лабораторных исследований на энтеропатогенные иерсинии в соответствии с трехуровневой Единой национальной системой индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней.

С учетом предложенного алгоритма и поставленных задач определяют материально-техническое оснащение лабораторий каждого уровня современным оборудованием, диагностическими препаратами и тест-системами. Разграничивают объем и номенклатуру исследований, внедряют современные подходы (ПЦР-скрининг, масс-спектрометрия, автоматизированные системы идентификации); проводят углубленный анализ выделенных культур по факторам патогенности и их молекулярно-генетическое типирование.

В заключении диссертационной работы соискатель в краткой форме представила и обсудила результаты проведенных исследований, наметила дальнейшую перспективу.

Оценивая, в целом, диссертацию можно заключить, что она представляет собой законченное исследование, направленное на решение актуальной научной задачи. Научная новизна, положения, выносимые на защиту, обоснованы и соответствуют заявленной цели исследования. Работа основана на значительном фактическом материале, собранном и обобщенном лично автором или при его непосредственном участии. Основные результаты отражены в 18 опубликованных статьях, представлены на научных конференциях различного ранга. Опубликованные работы и автореферат отражают содержание диссертации.

Отмечая достоинства рецензируемой работы, необходимо отметить, что при ее прочтении возникли некоторые замечания, в основном, редакционного плана. В тексте нередко пропущены знаки препинания, использованы неверные падежные

окончания. Обозначения биотипов представлены то арабскими, то римскими цифрами.

В разделе сокращений отсутствуют некоторые сокращения, которые хорошо бы туда внести (СЗФО – Северо-Западный федеральный округ; н.п. - нуклеотидные пары; мДа - мегадальтон). В тексте пульс-электрофорез сокращен как PFGE, а в разделе сокращений – PFGEA.

В разделе 2.2.3.1. (с. 52) указаны функции не всех упомянутых генов. В таблице 9 (стр. 58) первый столбец обозначен как «Наименование», но не указано чего.

По тексту диссертации имеются неудачные выражения (сыроедных овощей – с. 32; мишеневые гены – с. 40; отрицательные признаки – с. 83; отрицательные исследования – с. 119; серотипирование, биотипирование, исследование генов – это не маркеры, а процессы – с.6).

В разделе «Изучение фенотипических и генотипических особенностей *Y. pseudotuberculosis*» использован, на наш взгляд, не совсем удачный термин О-серогенотипирование. Используемый метод предполагает изучение структуры генов, кодирующих О-антиген, специфичный для каждого сероварианта. Тогда как метод серотипирования предполагает определение сероварианта с помощью специфических сывороток.

При прочтении диссертации возник ряд вопросов, на которые хотелось бы получить ответы в процессе защиты.

1. На стр. 14 представлена таблица 1 по таксономии *Yersinia*, в которой *Y. pestis* представлен как подвид *Y. pseudotuberculosis*. Между тем, в издании Bergey за 2005 г. эти два вида разделены. Хотелось бы услышать комментарии автора по этому вопросу.

2. Как зависит результативность бактериологического метода исследований от интенсивности эпидемического процесса?

3. Насколько широко используют метод фаготипирования для идентификации *Y. enterocolitica* или это метод для получения дополнительной характеристики штамма?

4. Насколько широко внедрены предложенные Вами Методические Указания «Организация и проведение лабораторных исследований на иерсиниозы на территориальном, региональном и федеральном уровнях»?

Следует подчеркнуть, что отмеченные недостатки не снижают достоинство работы и не влияют на ее общую положительную оценку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа КАРИМОВОЙ Татьяны Викторовны «Энтеропатогенные иерсинии: микробиологический мониторинг, молекулярно-биологические особенности, алгоритм лабораторной диагностики» является завершенной научно-квалификационной работой, направленной на усовершенствование лабораторной диагностики энтеропатогенных иерсиний. Работа соответствует специальности 03.02.03 – микробиология, что обосновано целью, задачами, методологией исследований, полученными результатами, положениями, вынесенными на защиту и выводами. Выполненная работа по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, связи исследований с научными темами, полноте публикаций в рецензируемых журналах полностью соответствует требованиям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постанов-

лениям Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник

Федерального казенного учреждения здравоохранения

Российский научно-исследовательский

противочумный институт «Микроб» Федеральной службы

по надзору в сфере защиты прав потребителей

и благополучия человека

кандидат биологических наук

410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

Тел: (8452) 26-21-31



Куклева Л. М.

Подпись Куклевой Л.М. заверяю:

Начальник отдела кадров

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

Роспотребнадзора



Шамшурина Е.Ф.