

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Касьян Жанетты Андреевны на тему «Разработка методических подходов и диагностических препаратов для определения видов и биоваров бруцелл на основе молекулярно-генетических технологий» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Заболеемость бруцеллезом в последние годы, особенно в неблагоприятных субъектах (Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа) Российской Федерации, продолжает оставаться неустойчивой. Ежегодно регистрируется от 300 до 500 новых случаев заболевания среди людей. В лабораторной диагностике бруцеллеза используют бактериологические, серологические, молекулярно-генетические и аллергические методы. Учитывая, что бактериологическое подтверждение выделения бруцелл регистрируется лишь в 10 % случаев, доказательством заболевания бруцеллезом является также их идентификация, определение видовой принадлежности и биоваров.

Существующие на сегодняшнее время диагностические препараты, в том числе и наборы реагентов для выявления ДНК бруцелл методом ПЦР, обнаруживают возбудителя бруцеллеза, но не позволяют установить видовую принадлежность выделенных штаммов. Сложившаяся эпидемическая обстановка обуславливает необходимость совершенствования методов лабораторной диагностики бруцеллеза. Определение видов и биоваров бруцелл на конкретных территориях и в очагах инфекции имеет важное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение как для классификации очагов и оценки степени напряженности эпидемического и эпизоотического процессов, так и для мониторинга обнаружения бруцелл и путей их распространения.

В связи с этим изучение варибельности фрагментов генома бруцелл, разработка новых препаратов и методических подходов для их идентификации с помощью современных молекулярно-генетических технологий, является актуальной.

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 137 страницах и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, в том числе одной главы с описанием используемых материалов и методов исследования, заключения, выводов и списка литературы; иллюстрирована 28 таблицами, 6 рисунками. Библиографический указатель включает 200 источников литературы, в том числе 37 отечественных и 163 зарубежных.

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований, приведены научная новизна, практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту, сведения об апробации и публикациях. Пять поставленных задач соответствуют цели работы и положениям, выносимым на защиту.

Научная новизна заключается в том, что получены новые данные о встречаемости отдельных генов у штаммов бруцелл с учетом их принадлежности к биоварам, а также подобраны ДНК-мишени *BR0262*, *BRA0420*, *BME11426*, *BME10994*, *BME110711*, *BRA054*, перспективные для разработки способов молекулярной идентификации различных видов бруцелл.

Требованиям научной новизны отвечает сконструированный на основе специфических генетических маркеров *BR0262*, *BME0711*, *BRA0541* набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», обеспечивающий определение видов или

групп видов бруцелл *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotoma* и их дифференциацию методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени с чувствительностью –  $1 \times 10^4$  м.к./мл и специфичностью – 99 % в пробах культур гетерологичных микроорганизмов, биологического материала и объектов окружающей среды.

Новыми являются данные по уточнению таксономического положения шести природных штаммов бруцелл из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», основанных на выявлении и изучении вариабельности различных участков генома бруцелл с помощью предложенного способа системы Bruce-Ladder, Suis-Ladder, AMOS-DEL, рестрикция *omp25*, *omp2a* и *omp2b* фрагментов генов ферментами *AluI*, *EcoRV*, *EcoRI* и *HindIII*.

Впервые с использованием комплекса молекулярно-генетических подходов у некоторых штаммов *B. abortus* и *B. suis* установлены амплификационные и рестрикционные профили, которые позволяют высказать предположение о возможности наличия двух субтипов *B. suis* 5 биовара и принадлежности культур, выделенных от мышевидных грызунов в Австралии в 1980 годы, к отдельному виду бруцелл.

В Главе 1 «Обзор литературы» проанализированы литературные источники и подробно представлена характеристика основных свойств бруцелл, в том числе, отличия различных видов друг от друга. Охарактеризованы штаммы *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, играющих наибольшую роль в заболевании человека, а также приведены факторы, способствующие распространению бруцеллеза. Следует отметить, что достаточно полно проанализированы сведения, касающиеся возможности проведения лабораторной диагностики бруцеллеза в настоящее время, в том числе, о наличии зарегистрированных диагностических препаратов и регламентирующих методов. Особое внимание уделено применению молекулярно-генетических технологий для выявления и идентификации бруцелл не только в нашей стране, но и за рубежом.

Учитывая вышеизложенное автор остановила свой выбор на ПЦР-методе с учетом результатов в режиме реального времени, как наиболее перспективном направлении в молекулярной диагностике, с подбором специфических праймеров, позволяющем выявлять и определять видовую и биоварную принадлежность бруцелл.

В Главе 2 "Материалы и методы исследования" Жанетта Андреевна подробно изложила методические приемы, с помощью которых были решены поставленные задачи. Следует отметить высокий уровень методических подходов и представительный объем проведенных исследований с применением микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов, что свидетельствует о высоком профессионализме соискателя. Объем фактического материала, полученного на зарегистрированном в установленном порядке оборудовании с использованием современных научных методов, является достаточным для проведения статистической обработки.

В Главе 3 изложены материалы, касающиеся поэтапной разработки набора реагентов для определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. В результате проведенного анализа *in silico* были отобраны гены, встречающиеся у *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* и *B. neotomae*, а также проведена оценка каждого локуса на

перспективность использования в качестве ДНК-мишени. Анализ полученных данных позволил автору выбрать специфичные участки генов *BR0262*, *BRA0541*, *ВМЕИ0711*, которые дифференцируют виды *B. melitensis*, *B. neotomae* и группы видов *B. abortus/B. ovis*, *B. suis/B. canis*. При этом автор творчески подошла к использованию референтных методик в качестве верификационных тестов, исключая фрагменты, которые ранее использовались другими авторами. В результате проведенных исследований показано, что чувствительность при амплификации каждого из подобранных генов бруцелл составила  $5 \times 10^3$  м.к./мл, а специфичность с гетерологичными микроорганизмами (*V. cholerae*, *Y. pestis*, *F. tularensis*, *Y. pseudotuberculosis*, *B. anthracis*, *S. aureus*) – 100 %.

На основе разработанного подхода были изготовлены экспериментальные серии «Набора реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Brucella* – идентификация – РГФ)», включающего три ПЦР-смеси: РС-1 содержит праймеры и зонды, специфичные к локусам *BR0262* и *ВМЕИ0711*; РС-2 – праймеры и зонды, специфичные к гену *BRA0541*; РС-3 – реагенты для постановки ПЦР. Высокая диагностическая ценность набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» установлена в межлабораторных, испытаниях при исследовании 18 штаммов *Brucella* spp., 2 штамма *B. ovis* и 15 штаммов гетерологичных микроорганизмов, а также сывороток крови, мочи, желчи, молока, сыра, воды открытых водоемов, искусственно контаминированных бруцеллами различных видов и гетерологичными, микроорганизмами. При этом чувствительность предложенного набора реагентов составила  $1 \cdot 10^4$  м.к./мл.

В результате проведенных клинических исследований на базе ФКУЗ СтавНИПЧИ на представительном материале, включающем 38 штаммов бруцелл различных видов, 15 гетерологичных микроорганизмов, а также 228 проб положительных образцов, контаминированных бруцеллами и 64 пробы гетерологичных микроорганизмов, была подтверждена чувствительность набора реагентов, равная  $1 \cdot 10^4$  м.к./мл. В указанной выше концентрации бруцеллы различных видов или групп видов выявлялись в 98,5 % исследуемых проб; специфичность составила 99 % с доверительной вероятностью 90 %.

Следующий этап работы (Глава 4) «Совершенствование способов идентификации видов бруцелл методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов» посвящен дальнейшему поиску генов, специфичных для каждого вида бруцелл и оценки их перспективности в качестве ДНК-матриц для идентификации *B. abortus/B. ovis* и *B. suis/B. canis*. С помощью комплекса предложенных амплификационных и рестрикционных методов соискатель уточнила видовую принадлежность исследуемых штаммов бруцелл. На основании полученных результатов был оптимизирован состав панели штаммов бруцелл, перспективной для применения в качестве контрольной при разработке новых подходов по молекулярной идентификации патогена. В дополнительных исследованиях при оптимизации способа определения видовой принадлежности бруцелл выбраны гены *bcs31*, *BRA0541*, *BRA0420*, *ВМЕИ1426*, *ВМЕИ0711*, *ВМЕИ0994*, позволяющие идентифицировать шесть основных видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*.

Для апробации и подтверждения диагностической ценности предложенного способа Жанетта Андреевна подобрала панели штаммов бруцелл, включающей 7 штаммов *B. abortus*, 3 штамма *B. melitensis*, 5 – *B. suis*, 2 – *B. ovis*, 1 – *B. canis*, 1 – *B. neotomae*, а также гетерологичные микроорганизмы. В результате проведенного исследования установлено, что исследованные образцы имели амплификационные профили, характерные для соответствующих видов бруцелл при выявлении каждого из указанных генов в мультилокусном формате в концентрации  $5 \times 10^3$  м.к./мл. Специфичность с гетерологичными микроорганизмами составила 100 %.

Подводя итог вышесказанному можно сделать заключение, что расширение спектра выявляемых видоспецифичных локусов генома бруцелл позволило автору повысить информативность разработанного способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ и осуществить дифференциацию сразу шести основных видов возбудителя бруцеллеза: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*.

Несомненный научный и практический интерес представляют сведения, отраженные в Главе 5 «Оценка эффективности разработанных подходов и других молекулярно-генетических методов для определения видовой принадлежности природных штаммов возбудителя бруцеллеза». В результате проведенных исследований установлена диагностическая ценность предложенного набора реагентов и оптимизированного способа для определения видов бруцелл на основе ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени при изучении природных штаммов *Brucella* spp. из фонда ГКПБ ФКУЗ НИПЧИ «Микроб». Подтверждена высокая специфичность подходов AMOSDEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder, рестрикционного анализа *omp25*, *omp2a*, *omp2b* генов ферментами *EcoRI*, *EcoRV*, *AluI*, *HindIII* для дифференциации видов и биоваров бруцелл.

Заслуживает внимание Глава 6, посвященная апробации комплекса молекулярно-генетических методов для идентификации возбудителя бруцеллеза при исследовании биологического материала от сельскохозяйственных животных. На основании проведенного молекулярно-генетического анализа подтверждена высокая диагностическая ценность комплекса молекулярно-генетических методов, так как все выделенные культуры идентифицированы как *B. abortus* 3b, 5, 6, 9 биоваров. При этом результаты молекулярной идентификации штаммов возбудителя бруцеллеза, выделенных из биологического материала от животных, полностью совпали с данными бактериологического анализа.

Результаты, полученные при апробации генодиагностического препарата и способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ при исследовании проб биологического материала от крупного рогатого скота на территории Гвинейской Республики, также свидетельствуют о высокой диагностической ценности разработанного набора реагентов и оптимизированного способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ. Убедительно показано, что использование комплекса молекулярно-генетических методов позволяет увеличить информативность и специфичность анализа, обнаруживать и идентифицировать до вида возбудитель бруцеллеза как на этапе исследований нативного материала, так и при выделении культуры микроорганизма, что подтверждено верификацией полученных результатов с помощью бактериологического метода.

В заключение диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая значимости полученных результатов. Научная новизна заключается в получении новых данных по встречаемости отдельных генов у штаммов бруцелл разных видов с учетом их принадлежности к биоварам. С использованием генетических маркеров *BR0262*, *ВМЕИ0711*, *BRA0541* разработан набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» для дифференциации видов и групп видов *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом ПЦР-РВ. Оптимизирован способ определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ, позволяющий дифференцировать основные 6 видов возбудителя бруцеллеза: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis*, *B. neotomae*.

Полученные в ходе выполнения работы Жанеттой Андреевной экспериментальные данные представляют не только научный интерес, но имеют большое практическое значение. Результаты исследований положены в основу разработки новых подходов для молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза. Расширены существующие представления о вариабельности геномов бруцелл различного таксономического положения, в том числе по встречаемости отдельных генов и фрагментов генов у штаммов бруцелл различных видов и биоваров.

Разработанный набор реагентов зарегистрирован в установленном порядке: – Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1948 15.09.2014 г. Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ». Подготовлены и утверждены Технические условия ТУ 9398-045-01898109-2013 и Инструкция по применению (приказ Росздравнадзора от 15 сентября 2014 года № 6451).

С использованием предложенных методических подходов уточнено таксономическое положение 44 природных штаммов бруцелл из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Результаты работы вошли в практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (г. Москва, 2013). Материалы диссертации используются на курсах повышения квалификации специалистов «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов», проводимых на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Материалы исследований отражены в автореферате и 8 печатных работах, из которых 3 опубликованы в периодических изданиях, рекомендуемых ВАК РФ. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах.

При рецензировании работы к автору возникло несколько вопросов. Жанетта Андреевна, какова стоимость набора реагентов, разработанных вами и ее сопоставимость с используемыми в лабораторной практике? На ваш взгляд, насколько будут востребованы новые наборы реагентов в диагностике бруцеллеза, так как МУ 3.1.7.1189-03 «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» введены в практику в 2003 г.?

В настоящее время разработаны Стандарты лабораторной диагностики по чуме, сибирской язве и холере для бактериологических лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. В этой связи известно вам что-либо по планированию разработки стандартов для диагностики бруцеллеза с целью включения, наряду с рутинными регламентирующими препаратами и методами, современные высокочувствительные препараты?

По существу замечаний нет. Вместе с тем следует отметить переизбыток представления полученных результатов в таблицах по тексту диссертации. Встречающиеся незначительные редакционные или технические погрешности, не влияют на высокую положительную оценку данной работы.

Таким образом, работа Касьян Ж. А. на тему «Разработка методических подходов и диагностических препаратов для определения видов и биоваров бруцелл на основе молекулярно-генетических технологий» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченным самостоятельным исследованием, которое по актуальности, объему, новизне, и практической значимости полученных результатов 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 медицинских 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: Sаяпина@expmed.ru

Подпись Саяпиной Л.В. удостоверяю:

Начальник отдела подготовки кадров  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Макаров А.В.