

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Касьян Жанетты Андреевны на тему
«Разработка методических подходов и диагностических препаратов для
определения видов и биоваров бруцелл на основе молекулярно-генетических
технологий» по специальности 03.02.03 – «Микробиология», представленной
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Бруцеллез является зооантропонозной инфекционной болезнью, распространенной практически во всем мире, которая наносит вред здоровью людей и значительный экономический ущерб животноводству. Возбудитель бруцеллеза относится к роду *Brucella*, который в свою очередь подразделяется на 12 видов: *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. papionis*, *B. vulpis*. На территории Российской Федерации зарегистрирована циркуляция 6 видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* и *B. canis*. Наиболее вирулентными для человека являются *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*. Поэтому при проведении лабораторной диагностики бруцеллеза важное значение имеет не только выделение культуры патогена, но и её идентификация с определением видовой принадлежности.

В соответствии с действующими МУ 3.1.7.1189-03 «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» для дифференциации видов бруцелл необходимо определение следующих параметров: отношение к избыточному содержанию углекислоты в атмосфере воздуха; продукция сероводорода; способность редуцировать основные красители (фуксин и тионин); агглютинация моноспецифическими сыворотками anti-*abortus* и anti-*melitensis*; лизис бруцеллезным диагностическим бактериофагом Тб. Выполнение таких исследований трудоемко, продолжительно и не позволяет

дифференцировать все основные виды бруцелл. Одним из перспективных подходов для определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза является полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации.

Материалы диссертации представлены на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (г. Москва, 2014); на VII ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (г. Москва, 2015); XII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах – участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года» (г. Саратов, 2016); II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2017); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017» (г. Москва, 2017); на научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в институте «Микроб» (г. Саратов, 2014, 2015, 2017 гг.); Материалы диссертации вошли в научные отчеты по законченным техническим и медицинским испытаниям наборов реагентов.

По теме диссертационной работы опубликовано 8 работ, из них 3 – в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России.

В ходе проведенных исследований использовались микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические, биоинформационные методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены лично автором или в соавторстве. Автореферат изложен на 22 страницах компьютерного текста, имеет традиционную

структуру – состоит из четырех разделов (общая характеристика работы, содержание работы, выводы, список основных работ, опубликованных по теме диссертации), а также включает 2 рисунка, 2 таблицы, список из 8 работ, опубликованных по теме диссертации. Содержание автореферата, в целом, соответствует основным положениям, выносимым на защиту, и выводам диссертации.

Новизна проведенных исследований заключается в том, что автором впервые получены новые данные по встречаемости отдельных генов у штаммов бруцелл разных видов с учетом их принадлежности к биоварам. На основании проведенного анализа *in silico* и *in vitro* определены перспективные ДНК-мишени для разработки способов молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза: *BR0262*, *BRA0420*, *BMEI1426*, *BMEI0994*, *BMEI0711*, *BRA0541*.

С использованием генетических маркеров *BR0262*, *BMEI0711*, *BRA0541* разработан набор реагентов для дифференциации видов и групп видов *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ».

Показана высокая диагностическая чувствительность – не менее 1×10^4 м.к./мл и специфичность – 99 % препарата при исследовании культур микроорганизмов, проб биологического материала и проб из объектов окружающей среды.

Оптимизирован способ определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, позволяющий дифференцировать основные 6 видов возбудителя бруцеллеза: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis*, *B. neotomae*. Способ основан на одновременной амплификации родоспецифичного гена *bcs₃₁* и фрагментов *BRA0420*, *BMEI1426*, *BMEI0994*, *BMEI0711*, *BRA0541*,

делетированных у определенных видов бруцелл. На данный способ получено положительное решение на выдачу патента (заявка № 2016137438 приоритет 19.09.2016).

Применение комплекса методических приемов, основанных на выявлении и изучении вариабельности различных участков генома бруцелл (разработанные нами способ и препарат, системы Bruce-Ladder, Suis-Ladder, AMOS-DEL, рестрикция *omp25*, *omp2a* и *omp2b* фрагментов генов ферментами *AluI*, *EcoRV*, *EcoRI* и *HindIII*), позволило с высокой точностью подтвердить и, в ряде случаев, уточнить таксономическое положение природных штаммов возбудителя бруцеллеза из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

С использованием комплекса молекулярно-генетических подходов у ряда штаммов *B. abortus* и *B. suis* установлены амплификационные и рестрикционные профили, которые ранее не были выявлены у представителей этих видов.

Расширены существующие представления о вариабельности геномов бруцелл различного таксономического положения. Получены новые данные по встречаемости отдельных генов и фрагментов генов у штаммов бруцелл разных видов и биоваров. Результаты исследования положены в основу разработки новых подходов для молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза.

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) на «Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ».

С использованием разработанных методических подходов уточнено таксономическое положение 44 природных штаммов бруцелл из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Внесены изменения в паспорта данных культур. Определена видовая и биоварная принадлежность выделенных проб из биологического материала от сельскохозяйственных животных.

Результаты работы вошли в практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (г. Москва, 2013). Материалы диссертации используются на курсах повышения квалификации специалистов «ИЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов», проводимых на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

К недостаткам работы следует отнести то, что в тексте автореферата бруцеллез отнесен к особо опасной зооантропонозной инфекционной болезни, что не соответствует международной и отечественной классификации (ММСП (2005 г.), СП 3.4.2318-08, МУ 3.1.7.1189-03); на страницах 5 и 13, имеются отдельные грамматические ошибки и опечатки, а также не удачные выражения (например, «наиболее вирулентные для человека», стр. 3). Однако отмеченные недостатки не снижают научной ценности и практической значимости работы.

Вывод: автореферат диссертации Касьян Жанетты Андреевны на тему «Разработка методических подходов и диагностических препаратов для определения видов и биоваров бруцелл на основе молекулярно-генетических

технологий» по специальности 03.02.03 – «Микробиология», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, соответствует п. 25 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а соискатель достоин присуждения ученой степени кандидата медицинских наук.

Отзыв составили:

Ведущий научный сотрудник

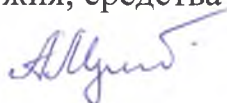
научно-исследовательского отдела

НИЦ (войсковая часть 23527, г. Киров) 48 ЦНИИ Минобороны России

доктор медицинских наук (специальность 20.02.23 –

специальные виды оружия, средства и способы защиты),

профессор



Миронин Александр Викторович

Научный сотрудник

научно-исследовательского отдела

НИЦ (войсковая часть 23527, г. Киров) 48 ЦНИИ Минобороны России

кандидат медицинских наук (специальность 20.02.23 –

специальные виды оружия, средства и способы защиты),

старший научный сотрудник



Чигринов Сергей Николаевич

«31» июля 2017 г.

Подписи ведущего научного сотрудника научно-исследовательского отдела НИЦ (войсковая часть 23527, г. Киров) 48 ЦНИИ Минобороны России доктора медицинских наук, профессора А.В. Миронина и научного сотру научно-исследовательского отдела НИЦ (войсковая часть 23527,

г. Киров) 48 ЦНИИ Минобороны России кандидата медицинских наук
С.Н. Чигринова удостоверяю.

ВрИО ученого секретаря научно-технического совета

НИЦ (войсковая часть 23527, г. Киров) 48 ЦНИИ Минобороны России

доктор медицинских наук,

профессор

« 7 » июля 2017 г.



Погорельский Иван Петрович