

ОТЗЫВ

научного руководителя по диссертационной работе

Касьян Жанетты Андреевны на тему:

«Разработка методических подходов и диагностических препаратов для определения видов и биоваров бруцелл на основе молекулярно-генетических технологий» представляемой на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

по специальности 03.02.03 -микробиология

Диссертационная работа Касьян Жанетты Андреевны выполнена в лаборатории молекулярной диагностики Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» в соответствии с плановой тематикой НИР 53-2-14 «Новые диагностические технологии в мониторинге особо опасных инфекционных болезней, индикации возбудителей и расширенном изучении свойств штаммов», а также в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 - 2014 годы).

Актуальность проведенного научного исследования, посвященного разработке методических подходов для определения видовой принадлежности бруцелл, определяется существованием на территории Российской Федерации многочисленных неблагополучных по бруцеллезу пунктов и ежегодной регистрацией случаев заболевания бруцеллезом людей.

На территории России зарегистрирована циркуляция 6 видов бруцелл, из которых основную роль в заболеваемости людей играют *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. С этой целью в соответствии с действующими нормативно - методическими документами (МУ 3.1.7.1189-03) используют ряд биохимических тестов, определяют чувствительность к моноспецифическим сыворотками и бруцеллезному диагностическому бактериофагу. Выполнение данных исследований трудоемко, продолжительно и не позволяет дифференцировать все основные виды и биовары бруцелл. В последние годы особую актуальность для определения видовой принадлежности возбудителя

бруцеллеза приобрели молекулярно-генетические методы. Однако большинство предложенных подходов имеют электрофоретическую детекцию результатов и низкую чувствительность реакции, а разработанные ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени недостаточно информативны и обеспечивают идентификацию лишь отдельных видов или групп видов патогена. Помимо этого данных об их применении на РФ нет. Поэтому существует необходимость разработки простых и быстрых способов дифференциации видов и биоваров бруцелл с помощью ПЦР и создание генодиагностических препаратов для молекулярной идентификации патогена.

Для выполнения поставленной цели Касьян Ж.А. проведено изучение большого объема литературных данных, посвященных сравнению полных геномов возбудителя бруцеллеза, существующих методов идентификации видов и биоваров бруцелл, а также нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank NCBI. На основании проведенного анализа *in silico* и *in vitro* определены перспективные ДНК-мишени для конструирования набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РФ»: *BR0262*, *BRA0541*, *BMEII0711*, выявление которых методом ПЦР-РВ позволяет дифференцировать виды *B. melitensis*, *B. neotomae* и группы видов *B. abortus/B. ovis*, *B. suis/B. canis*. Подобраны праймеры и зонды для амплификации данных участков, оптимизирован состав реакционных смесей. На основе разработанного подхода подготовлены 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 – РФ)». Для определения диагностической ценности сконструированного набора реагентов проведены межлабораторные и клинические испытания. Разработанный набор зарегистрирован в установленном порядке (№ РЗН 2014/1948 15.09.2014 г.). Набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РФ» обладает высокой чувствительностью – 1×10^4 м.к./мл и специфичностью – 99 %. Однако для ряда видов патогена с помощью него была возможна только групповая идентификация: *B. abortus/B. ovis* и *B. suis/B. canis*. В связи с этим была очевидна необходимость оптимизации предложенного препарата с целью повышения его информативности. Для решения данного вопроса Жанеттой Андреевной проведен дальнейший поиск

генов, специфичных для каждого вида бруцелл и оценка их перспективности для использования в качестве ДНК-матриц. В результате с целью оптимизации разработанного ранее набора реагентов Касьян Ж.А. было предложено использовать в качестве ДНК-мишеней 6 генетических локусов: *bcspr31*, *BRA0420*, *BRA0541*, *BMEI1426*, *BMEI0711*, *BMEI0994*, амплификация которых позволяет идентифицировать виды: *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*. Чувствительность реакции каждого из указанных генов составила не менее 5×10^3 м.к./мл, а специфичность – 100 %. На данный способ оформлена заявка на выдачу патента, имеется положительное решение (заявка № 2016137438 приоритет 19.09.2016).

С использованием разработанных методических подходов, а также зарубежных систем дифференциации видов и биоваров бруцелл (Bruce-Ladder, Suis-Ladder, AMOS-DEL) и рестрикционного анализа генов *omp25*, *omp2a* и *omp2b* ферментами *AhaI*, *EcoRV*, *EcoRI* и *HindIII* Касьян Ж.А. было подтверждено и в ряде случаев уточнено таксономическое положение 44 природных штаммов бруцелл из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Более того, при использовании комплекса молекулярно-генетических подходов у ряда штаммов *B. abortus* и *B. suis* были установлены амплификационные и рестрикционные профили, которые ранее не выявлялись у представителей этих видов. У двух штаммов *B. suis* (С-540, С-541) при исследовании с помощью системы Suis-Ladder получены амплификационные профили, не соответствующие ни одному из характерных для типичных пяти биоваров *B. suis*. При дальнейшем их изучении с помощью MLVA-типирования были получены результаты, согласующиеся с полученными нами ранее. Исходя из данных исследования штаммы *B. suis* С-450 и С-451 могут быть определены как новый субтип *B. suis* 5 биовара.

Для штамма *B. abortus* 3143-П с помощью комплекса используемых методов установлено наличие делеции *BMEI0994-BMEI0998*. Результаты филогенетического анализа подтвердили принадлежность данного штамма к виду *B. abortus*.

Результаты ПЦР, рестрикционного анализа, MLVA-типирования, филогенетического анализа по данным полногеномного секвенирования *B. abortus* С-549, полученные Касьян Ж.А., указывают на то, что этот штамм не принадлежит ни к одному из существующих видов бруцелл и наряду с другими австралийскими штаммами может являться отдельным видом патогена.

В результате проведенной работы, Жанеттой Андреевной подтверждена эффективность предложенного препарата и способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ при изучении природных штаммов *Brucella* spp. из фонда ГКПБ «Микроб» Роспотребнадзора. Кроме этого, показана высокая специфичность разработанных ранее подходов для молекулярной идентификации бруцеллеза (AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder, рестрикционный анализ генов *omp25*, *omp2a*, *omp2b*).

Помимо этого, разработанный набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» и способ определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ были апробированы Жанеттой Андреевной при исследовании 238 биологического материала, полученного от крупного и мелкого рогатого скота как на территории Российской Федерации, так и за рубежом – Республика Гвинея.

Диссертационная работа Жанетты Андреевны выполнена на высоком методическом уровне с применением современных технологий (ПЦР, рестрикционный анализ, MLVA-типирование, полногеномное секвенирование).

Материалы диссертационной работы представлены на многочисленных научных конференциях различного уровня, в том числе с международным участием. Результаты работы вошли в практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (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.

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.

Диссертационная работа Касьян Ж.А. обладает несомненной научной новизной и весомым практическим выходом. Научная новизна исследования подтверждена положительным решением о выдаче патента. Новый, разработанный Жанеттой Андреевной в рамках выполнения диссертации, современный методический подход способствует повышению эффективности молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза.


Диссертация Касьян Ж.А. является законченной научно-квалификационной работой, полностью отвечает требованиям «Положений о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Российской Федерации, и может быть представлена к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.02.03 - микробиология.

Научный руководитель,
Зав. лабораторией
молекулярной диагностики
отдела диагностики
инфекционных болезней
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора
к.б.н.

 / Н.А. Осина /

Подпись Н.А. Осинной заверяю
И.О. начальника отдела кадров
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора



 / Е.Ф. Шамшурина /

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46.

Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12. E-mail: rusrapi@microbe.ru.