

## Отзыв

научного руководителя по диссертационной работе

Сеничкиной Айслу Мухамятовны на тему:

«Разработка способов выявления и идентификации штаммов *Francisella tularensis* с помощью молекулярно-генетических методов», представляемой на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –микробиология

Диссертационная работа Айслу Мухамятовны Сеничкиной выполнена в лаборатории молекулярной диагностики Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» в соответствии с плановой тематикой НИР 39-2-09 «Усовершенствование лабораторной диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций», а также Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 - 2014 годы).

Актуальность проведенного научного исследования, посвященного разработке способов выявления и идентификации штаммов туляремийного микроба, связана с тем, что во многих субъектах Российской Федерации и в мире в последние годы регистрируется спорадическая или вспышечная заболеваемость данной инфекцией и сохраняется эпидемиологическая напряженность по этой нозологии. Прежде всего, это связано с наличием широко распространенных на территории нашей страны природных очагов туляремии, которые характеризуются высокой стойкостью. Сохранение и циркуляция возбудителя в природе осуществляется при участии млекопитающих, эктопаразитов, двукрылых кровососущих насекомых, а передача инфекции человеку может происходить различными путями. Поэтому своевременное обнаружение патогена в биологическом материале и объектах окружающей среды имеет важное значение.

Традиционно лабораторная диагностика туляремии, направленная на индикацию возбудителя, основывается на применении биологического, иммуносерологических, бактериологического методов. Однако использование таких приемов достаточно длительно и трудоемко. В соответствии с МУ 3.2-2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» для выявления ДНК туляремийного микроба в пробах различного происхождения предусмотрено использование ПЦР. В тоже время на момент начала исследования отсутствовали зарегистрированные генодиагностические препараты для обнаружения *F. tularensis*. Существовала необходимость разработки современных и информативных способов выявления и идентификации возбудителя туляремии.

Поскольку патогенность *F. tularensis* зависит его от подвида важно проводить внутривидовую дифференциацию культур патогена. Циркулирующий на территории РФ голарктический подвид туляремийного микроба включает три биовара (эритромицин-чувствительный (*Ery<sup>S</sup>*), эритромицинустойчивый (*Ery<sup>R</sup>*) и японский (*japonica*)), а распространенный зарубежом подвид *tularensis* представлен двумя субпопуляциями (AI и AII). Постоянные миграционные процессы могут приводить к завозу на территорию нашей

страны других подвидов и субпопуляций этого возбудителя. Поэтому необходимым является определение биоварной и субпопуляционной принадлежности *F. tularensis*.

Используемые в соответствии с нормативно-методическими документами для подвидовой идентификации биохимические тесты, биологический метод продолжительны по времени и трудоемки. Значительно сократить сроки исследования позволяют молекулярно-генетические технологии. Однако на сегодняшний день отсутствуют методические приемы для одновременного определения всех подвидов возбудителя туляремии с помощью молекулярно-генетических методов. Отсутствуют сведения о возможности определения подвидовой принадлежности у штаммов возбудителя туляремии при использовании секвенирования. В связи с вышесказанным актуальным является разработка методических приемов для обнаружения и идентификации туляремийного микроба с установлением его подвида, биовара и субпопуляции.

Для выполнения поставленной цели А.М. Сеничкиной проведено исследование 116 штаммов *F. tularensis*, из них подвидов *tularensis* - 9, *holarctica* - 105 (биоваров *japonica* - 5, *Ery<sup>s</sup>* и *Ery<sup>s</sup>* - 98), *mediasiatica* - 2 и *novicida* - 2 различного происхождения, 38 штаммов гетерологичных микроорганизмов, а также проб клинического, биологического материала и из объектов окружающей среды. С целью выбора ДНК-мишеней для разработки способов индикации и ускоренной идентификации туляремийного микроба с помощью ПЦР Айслу Мухаматовной был проведен анализ данных литературы по организации генома и факторах вирулентности патогена, по применению различных молекулярно-генетических методов для выявления ДНК *F. tularensis* в пробах различного происхождения, подвидовой, биоварной и субпопуляционной дифференциации штаммов туляремийного микроба.

По полученным в диссертации результатам Сеничкиной сконструировано два набора реагентов для выявления ДНК возбудителя туляремии в пробах клинического, биологического материала и объектах окружающей среды, и также его идентификации, в случае выделения культуры патогена, методом ПЦР с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, основанные на амплификации фрагмента видоспецифичных для туляремийного микроба генов *iglBC*. Чувствительность препаратов составила  $1 \times 10^3$  м.к./мл и специфичностью - 100%. Эффективность разработанных генодиагностических препаратов продемонстрирована при исследовании проб суспензий органов млекопитающих, эктопаразитов, из объектов окружающей среды в ходе эпизоотологического мониторинга туляремии на территории РФ.

Айслу Мухаматовной благодаря ее заинтересованности и хорошему владению методами лабораторной диагностики туляремии проведено сравнение эффективности ПЦР с использованием созданных наборов реагентов и других методических приемов (бактериологический, бактериоскопический, иммуносерологический (ИФА, МФА, ИХА) анализ) при выявлении *F. tularensis* в образцах биологического материала, полученных от животных с экспериментальной туляремийной инфекцией.

На основании полученных результатов установлена высокая диагностическая эффективность ПЦР (не менее 98 %) с разработанными наборами реагентов при анализе проб, начиная с 3 дня с момента заражения вне зависимости от инфицирующей дозы.

Диссертантом показано, что информативность молекулярно-генетического анализа повышается в случае исследования не только материала, предусмотренного для данного вида исследования действующими нормативно-методическими документами, но и проб суспензий легких животных, особенно на начальной стадии развития инфекционного процесса.

Отличительной чертой этого диссертационного исследования является высокий методический уровень проведения исследований, использование современных молекулярно-генетических технологий (ПЦР и секвенирование) и биоинформационного анализа.

В результате проведенной работы Сеничкиной получены новые данные по вариабельности генома штаммов *F. tularensis* разных подвидов, биоваров и генетических групп. На основании полученных данных подобраны генетические локусы, перспективные в качестве ДНК-мишеней при разработке методов молекулярной идентификации возбудителя туляремии. Диссертантом предложен способ определения подвидов туляремийного микроба методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, который характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Отмечено совпадение результатов идентификации штаммов туляремийного микроба из фонда ГКПБ «Микроб», полученные с помощью разработанного способа и методов, рекомендованными для этих целей ВОЗ.

Айслу Мухамятовной впервые установлена возможность подвидовой, биоварной и субпопуляционной дифференциации штаммов возбудителя туляремии с помощью секвенационного анализа фрагмента *sdhA* гена в совокупности с одним из амплификационных методов идентификации возбудителя туляремии: анализом в ПЦР RD1-области (ВОЗ), ПЦР с использованием случайного праймера Ch1f (референс центр по туляремии, ФБУН ГНЦ ПМБ) или разработанной ею мультилокусной ПЦР.

Для контроля молекулярной идентификации туляремийного микроба с помощью ПЦР и секвенирования Сеничкиной А.М. подобраны референтные штаммы *F. tularensis*, которые стабильно сохраняют генетические маркеры, характерные для вида, подвида, биовара и субпопуляции. На данные штаммы получен патент на изобретение (№ 2443772 от 26.07.2012).

Полученные результаты вошли в материалы практического руководства «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (Москва, ЗАО «Шико», 2013 г.), используются при чтении лекций и проведении практических занятий на курсах повышения квалификации «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов» при РосНИПЧИ «Микроб». Результаты по молекулярно-генетической характеристике штаммов *F. tularensis* использованы для пополнения паспортных данных штаммов из «Государственной коллекции патогенных бактерий» при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Результаты работы представлены на многочисленных российских конференциях. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 - в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России». Получен 1 патент.

