

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ и ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
<http://www.bionet.nsc.ru>
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

от 04.06.2019 № 15345-29-2171
на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИЦиГ СО РАН

Член-корр. РАН

Кочетов А.В.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Иголкиной Яны Петровны «Молекулярно-генетический анализ риккетсий, циркулирующих на территории Западной Сибири и Дальнего Востока», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Актуальность.

Диссертационная работа Иголкиной Я.П. посвящена изучению встречаемости и разнообразия бактерий рода *Rickettsia* на территории Западной Сибири и Дальнего Востока в популяциях различных видов клещей и в клинических образцах пациентов с признаками инфекционного процесса после укуса клеща. Бактерии рода *Rickettsia* у человека вызывают такие заболевания, как сыпной тиф, сибирский клещевой тиф, дальневосточный клещевой риккетсиоз и другие. Многие виды риккетсий переносятся клещами, причем уровень инфицированности риккетсиями в популяциях некоторых видов клещей может превышать 60%. К настоящему моменту на территории азиатской части РФ описано два заболевания, этиологическим агентом которых являются *Rickettsia sibirica* и *R. heilongjiangensis*. Однако, выявляются случаи присутствия ранее считавшихся непатогенных видов риккетсий у пациентов с клиническими проявлениями инфекционного процесса после укуса клеща. Кроме того, у клещей молекулярно-генетическими методами выявляются новые виды риккетсий, о патогенности которых можно только строить догадки. Таким образом, диссертационная работа направлена на решение важной задачи: изучение генетического разнообразия риккетсий, переносимых клещами в азиатской части РФ.

Научная новизна и практическая ценность.

Результаты работы в значительной степени расширяют представление о встречаемости и генетическом разнообразии бактерий рода *Rickettsia* в популяциях иксодовых клещей на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, включая остров Сахалин и Камчатку. Разработана оригинальная лабораторная методика родо- и видоспецифичной ПЦР риккетсий. На основе обширного материала соискателем для ряда территорий впервые показано разнообразие риккетсий в клещах *Ixodes pavlovskyi*, *I. trianguliceps*, *I. apronophorus*, *I. persulcatus*. У одного вида клеща обнаружен новый вариант риккетсий, который причислен к потенциально новому виду «*Candidatus Rickettsia uralica*». По генам 16S rRNA, *ompB* и *sca4* подтвержден кандидатный статус видов *Candidatus Rickettsia rara* и *Candidatus R. principis*. Впервые на территории России в клинических образцах пациентов выявлена ДНК *Rickettsia aeschlimannii*, *R. raoultii*, *R. slovaca* и «*Candidatus R. tarasevichiae*», а также новых геновариантов риккетсий из группы клещевой пятнистой лихорадки.

Общая характеристика диссертационной работы.

Структура диссертации Иголкиной Я. П. соответствует классической схеме и состоит из разделов: обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Полный текст работы, включая список литературы, изложен на 132 страницах. Работа содержит 22 рисунка, 17 таблиц и 173 литературных источника.

Во введении диссертационной работы соискатель обосновывает актуальность работы, теоретическую и практическую значимость и научную новизну, а также приводит сведения об апробации работы, публикациях по теме диссертации и личном вкладе автора. Цель исследования и задачи сформулированы корректно; положения, выносимые на защиту, базируются на ключевых результатах диссертационного исследования.

Глава 1. Обзор литературы.

Глава состоит из семи разделов и заключения. Соискатель достаточно подробно останавливается на истории исследования риккетсиозов, вопросах биологии риккетсий, клинических аспектах и методах диагностики риккетсиозов, приводит данные по клещевым риккетсиозам на территории РФ. Риккетсий подразделяют на несколько групп: этиологические агенты клещевых пятнистых лихорадок (сокращенно КПЛ), сыпнотифозных лихорадок (СТ), риккетсии из групп *R. canadensis* и *R. bellii*. Клещи переносят возбудителей группы КПЛ, хотя есть и исключения; например, *R. felis* – возбудитель калифорнийского блошиного риккетсиоза. Кроме того, клещи переносят риккетсий, не относящиеся к группе КПЛ: *R. bellii*, *R. canadensis* и «*Candidatus R. tarasevichiae*». Список видов представителей группы КПЛ продолжает расширяться и, к настоящему моменту, описано 26 видов риккетсий, для 16 из них показана способность вызывать заболевания у человека. Первые случаи клещевого риккетсиоза в России описаны в 1930-40 х гг. на Дальнем Востоке, Алтае и в Красноярском крае. В западной части России клещевые риккетсиозы были отмечены в Крыму и в Астраханской области. Подробно приводятся данные по встречаемости различных видов риккетсий среди клещей на территории РФ, указываются клинические проявления риккетсиозов. В заключение обзора литературы соискатель кратко обобщает особенности биологии риккетсий и подчеркивает актуальные вопросы исследований риккетсий и риккетсиозов для обширной территории РФ.

В этом разделе встречается несколько незначительных недочетов редакторского характера, таких как пропуски слов, предлогов или избыточные повторы в предложениях, смешение англоязычного и русскоязычного написания имен авторов, излишнее использование скобок. Некоторые рисунки переведены на русский язык,

тогда как другие остались с англоязычными указаниями (например, рисунок 1-3).

Глава 2. Материалы и методы.

Глава состоит из семи разделов. Здесь указано кем предоставлен обширный материал клещей, использованный в работе, а также подробно дано описание участков, где были проведены сборы. В частности, сборы проводились в Хабаровском и Камчатском крае, Амурской, Сахалинской, Новосибирской, Омской областях, Республике Алтай. Всего в диссертационном исследовании использовано 3849 особей клещей. Клинические образцы 604 пациентов получены из ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница №1». Указано, каким образом проводилась пробоподготовка материала и выделение ДНК, обоснована стратегия проведения молекулярно-генетического анализа риккетсий, приведены условия ПЦР реакций, использованные праймеры, номера нуклеотидных последовательностей, депонированных в базе данных NCBI. Описано, каким образом проводился анализ нуклеотидных последовательностей, статистический анализ.

Вызывает сомнение правомочность выделения в главе 2 двух самостоятельных разделов, а именно «2.1 Материалы», где перечисляются реактивы и готовые коммерческие наборы, и «2.2. Буферы и основные растворы».

Глава 3. Результаты.

Глава «Результаты» состоит из восьми разделов. Соискатель начинает с обоснования выбора праймеров для родо- и видоспецифичной ПЦР. Для выявления риккетсий в исследуемых образцах использовали две пары праймеров, родоспецифичных к гену цитратсинтазы. Для генетического описания риккетсий использовали участки генов 16 SrRNA, *ompA*, *ompB*, *sca4*. Поскольку в случае микст-инфекции определение видов затруднительно, соискатель использовал видоспецифичные праймеры.

Указано, что «вид клещей определяли морфологически», однако нет ссылки на ключ и не понятно, делал ли это сам соискатель или же эта информация предоставлялась специалистами, которые предоставляли материал. Здесь же отмечено, что «видовая принадлежность видов близкородственных клещей из областей симпатрии дополнительно подтверждалась генетическими методами», однако является ли этот метод оригинальным или основывается на ранее опубликованном методе не указывается.

Далее подробно описываются результаты скрининга клещей, собранных в различных регионах, приводится процентное содержание риккетсий в популяциях и в отдельных видах клещей, рассчитаны доверительные интервалы, отмечаются региональные особенности, случаи микст-инфекции и дается молекулярно-генетическая характеристика изолятов. По генетическому разнообразию только один вид оказался высоко консервативным по исследуемым генетическим маркерам – *Candidatus R. tarasevichiae*. Для остальных видов отмечалась разная степень вариации нуклеотидной последовательности. Необходимо отметить, что для некоторых видов были впервые определены нуклеотидные последовательности генов, важных для идентификации риккетсий. Приводятся сравнения сходства нуклеотидных последовательностей генов разных видов риккетсий. Эти данные достаточно подробно описаны в тексте диссертационной работы, а также представлены в виде таблиц и филогенетических деревьев. Важные результаты получены при скрининге клинического материала пациентов ГБУЗ НСО ГИКБ № 1. В 37 случаях удалось не только выявить факт присутствия ДНК риккетсий, но и определить их видовую принадлежность. В большинстве случаев это оказались *R. sibirica sibirica* и *R. raoultii*, а также, в единичных случаях, *Candidatus R. tarasevichiae*, *R. slovacae*, *R. aeschlimannii* и новые генетические варианты риккетсий из группы КПЛ. Для этих случаев соискатель приводит сводную таблицу по клиническим симптомам пациентов.

Глава 4. Обсуждение.

В этой главе соискатель на девяти страницах резюмирует основные полученные результаты и обсуждает их.

В заключение работы еще раз подводится итог диссертационного исследования, отмечаются результаты, которые в значительной степени расширяют представления о встречаемости и разнообразии бактерий рода *Rickettsia* в Западной Сибири и на Дальнем Востоке. Отмечается, что значительная часть исследованных клещей оказались носителями нескольких видов риккетсий, что указывает на потенциальную опасность для человека одновременного инфицирования разными патогенными агентами. Выводы сформулированы четко и соответствуют поставленной цели и задачам работы.

Заключение.

Диссертационная работа Иголкиной Я. П. «Молекулярно-генетический анализ риккетсий, циркулирующих на территории Западной Сибири и Дальнего Востока» представляет собой законченное и оригинальное исследование, в котором были получены новые и значимые данные. Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, так как в работе проведен детальный молекулярно-генетический анализ нескольких видов риккетсий из различных видов иксодовых клещей и из клинических образцов пациентов, в автор диссертации, Иголкина Яна Петровна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Заключение принято на межлабораторном семинаре Отделения генетики животных и человека ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН. Присутствовало 30 человек. Результаты голосования: «за» - 30 чел., «против» - 0 чел., воздержались – 0 чел. Протокол № 04 от 03.06.2019 г.

Председатель семинара
профессор, д.б.н.

М.П. Мошкин

Секретарь Отделения
к.б.н.

И.Е. Колосова

Ведущий научный сотрудник
лаб. молекулярной генетики насекомых, к.б.н.

Ю.Ю. Илинский



Мошкин М.П.; Колосова И.Е.; Илинский Ю.Ю.