

ОТЗЫВ

официального оппонента 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 темы исследования. В России среди природно-очаговых инфекций, переносимых иксодовыми клещами, по уровню заболеваемости и широте распространения одно из ведущих мест занимают клещевые риккетсиозы. В последние годы представления о распространении, таксономии, экологии и патогенности некоторых видов риккетсий существенно изменились. В различных регионах мира обнаружен целый ряд новых риккетсий, переносимых клещами, часть из которых может обрести статус самостоятельного вида. Несмотря на большое число публикаций о выявлении новых видов риккетсий в иксодовых клещах, данные об их географическом распространении, уровню инфицированности переносчиков разных видов, тропизме к определенному виду переносчика, генетической вариабельности ограничены и требуют уточнения. Данные о спектре и генетической вариабельности риккетсий в зонах симпатрии иксодовых клещей близкородственных видов на территории России практически отсутствуют. Генетическая вариабельность риккетсий, инфицирующих клещей с гнездово-норовым типом паразитизма и межвидовых гибридов *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi*, не изучалась.

В последнее время выявлен и охарактеризован ряд риккетсий группы КПЛ и кандидатных видов, существенно отличающихся от классического возбудителя клещевого риккетсиоза - *R. sibirica*, однако роль различных видов *Rickettsia* spp. в инфекционной патологии человека остается недостаточно исследованной. Для решения всех вышеперечисленных проблем необходима разработка и применение надежных методов детекции, идентификации и дифференциации разных видов риккетсий в иксодовых клещах и клиническом материале.

Именно этим важным и актуальным аспектам посвящена диссертационная работа Я.П. Иголкиной.

Для достижения данной цели диссертантом было поставлено пять задач, которые были успешно решены в ходе выполнения работы.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, трех глав, включающих описание использованных в работе материалов и методов, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Библиография включает 173 источника, в том числе 151 работу зарубежных и 22 работы отечественных авторов. Работа изложена на 132 страницах, хорошо иллюстрирована, содержит 22 рисунка и 17 таблиц.

В разделе «**Введение**» соискателем обосновывается актуальность и оценивается степень разработанности выбранной темы, формулируются цель и задачи, необходимые для ее решения.

Глава 1 состоит из восьми подразделов, в которых с привлечением данных зарубежных и отечественных авторов диссертант обсуждает различные аспекты проблемы риккетсиозов, начиная от истории их открытия, морфологии, таксономии, географического распространения до организации генома риккетсий, клиники и лабораторной диагностики заболеваний, вызванных отдельными видами риккетсий. Приводятся критерии, необходимые для описания новых кандидатных видов риккетсий группы КПЛ.

В заключении к главе автор приходит к выводу, что в связи с меняющимися в последние годы представлениями об ареале и патогенности риккетсий, инфицирующих иксодовых клещей, обнаружением новых видов *Rickettsia* spp. необходимо проведение широкомасштабных исследований, направленных на изучение распространения и видового разнообразия риккетсий в клещах и клинических образцах пациентов. Также диссертант отмечает, что в качестве основного инструмента для проведения исследования должны быть использованы молекулярно-генетические методы, которые позволяют решать филогенетические, популяционные и эпидемиологические вопросы, проводить тонкую межвидовую дифференциацию риккетсий.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит сведения об объеме и видах исследованного материала, ключевых участках сбора иксодовых клещей. Диссертантом тщательно проанализирован огромный фактический материал, включающий около 4000 экз. иксодовых клещей разных видов и клинические образцы от 604 пациентов.

Работа выполнена на хорошем методическом уровне. В ней использован комплекс молекулярно-генетических методов, в том числе ПЦР с использованием праймеров, разработанных диссертантом лично. Надежность проведенной идентификации риккетсий подтверждена секвенированием образцов. Для верификации диагноза клещевого риккетсиоза у пациентов применен иммунологический анализ. Весь полученный материал подвергнут статистическому анализу с помощью стандартных методов вариационной статистики.

Глава 3 посвящена результатам, полученным диссертантом в ходе работы.

В подглаве 3.1. описаны выбранные соискателем праймеры для родо- и видоспецифичной ПЦР.

В подглаве 3.2. диссертант анализирует результаты, полученные в ходе углубленного исследования различных видов иксодовых клещей и межвидовых гибридов *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi* на наличие ДНК *Rickettsia* spp. по отдельным территориям, входящим в состав двух изучаемых регионов, а затем объединяет полученные данные. В том числе изучается инфицированность переносчиков различными видами риккетсий в областях

симпатрии иксодовых клещей нескольких видов, а также клещей, снятых с мелких млекопитающих. Автор отмечает, что разные виды риккетсий ассоциированы с определенными видами клещей, выявляет особенности спектра *Rickettsia* spp., встречающихся в переносчиках на территории отдельных регионов, описывает случаи микст-инфицирования клещей *Rickettsia* spp.

Подглава 3.3 посвящена генетической характеристике риккетсий, выявленных диссертантом в иксодовых клещах. Все образцы риккетсий охарактеризованы по гену *gltA*, а некоторые из них дополнительно по гену 16S рРНК и генам поверхностных белков (*ompA*, *ompB* и *sca4*). Дается оценка генетической вариабельности каждого из выявленных видов риккетсий.

В подглаве 3.4 Я.П. Иголкина проводит филогенетический анализ трех кандидатных видов риккетсий – «*Candidatus R. uralica*», «*Candidatus R. gara*» и «*Candidatus R. principis*», рассматривает их с точки зрения соответствия существующим критериям, необходимым для присвоения статуса кандидатного вида, доказывает правомерность их аттестации в качестве кандидатных видов риккетсий группы КПЛ.

Подглавы 3.6-3.8 посвящены детекции ДНК риккетсий в клиническом материале пациентов, генотипированию обнаруженных изолятов, описанию особенностей симптоматики и сероконверсии у больных риккетсиозами.

В главе 4 с сопоставлением данных научной литературы проводится обсуждение результатов, полученных диссертантом в ходе исследования.

В заключении автор обобщает полученные данные и делает вполне обоснованные выводы.

Достоверность полученных диссертантом данных, выводов и сформулированных основных положений, выносимых на защиту, базируется на анализе огромного объема фактического материала, использовании надежной методики индикации и идентификации риккетсий, результаты применения которой подтверждены секвенированием.

Научная новизна исследования не вызывает сомнения. Впервые с помощью разработанной диссертантом методики проведены широкомасштабные целенаправленные исследования по изучению распространения и генетического разнообразия риккетсий, инфицирующих иксодовых клещей на территории Западной Сибири и Дальнего Востока. Я.П. Иголкиной показана ассоциированность разных видов и геновариантов риккетсий с определенными видами клещей. Приоритетными являются данные о распространении и генетическом разнообразии риккетсий в клещах *I. pavlovskyi* и межвидовых гибридах *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi*, а также в клещах *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* в зонах симпатрии этих видов на территории Западной Сибири. Соискателем впервые выявлен новый кандидатный вид риккетсий «*Candidatus Rickettsia uralica*» в клещах *I. trianguliceps*. В соответствии с существующими критериями впервые охарактеризованы «*Candidatus Rickettsia principis*» и «*Candidatus Rickettsia gara*», доказана правомерность их аттестации в качестве кандидатных видов. Впервые выявлены *Rickettsia canadensis* и *Rickettsia aeschlimanii* в клещах

Haemaphysalis spp. в азиатской части России. Большой научный и практический интерес представляют данные о выявлении в образцах материала от пациентов, помимо *R. sibirica*, ДНК других видов риккетсий (*R. raoultii*, «*Candidatus R. tarasevichiae*», *R. slovacca*, *R. aeschlimannii*), а также новых геновариантов риккетсий группы КПЛ.

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в существенном расширении имеющихся знаний о структуре популяций риккетсий в очагах клещевого риккетсиоза и ареалах риккетсий группы КПЛ в азиатской части России, в том числе в местах обитания симпатрических видов-переносчиков, в получении новых данных об ассоциированности разных видов риккетсий с определенными видами клещей родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis*.

Практическая значимость работы заключается в разработке лабораторного варианта методики, основанной на проведении родо- и видоспецифичной ПЦР для выявления и идентификации риккетсий в клещах и биологическом материале пациентов. Учитывая тот факт, что эта методика позволяет проводить дифференциацию широкого спектра наиболее распространенных на территории России риккетсий, она имеет универсальный характер и может быть применена и в других регионах РФ.

Полученные в ходе исследования результаты важны с точки зрения повышения эффективности лабораторной диагностики риккетсиозов, этиологической расшифровки диагноза, повышения качества лечения больных. Полученные диссертантом данные являются базой для дальнейшего проведения молекулярно-генетического мониторинга на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, они необходимы для совершенствования системы эпидемиологического надзора за риккетсиозами в РФ.

Впечатляет количество определенных диссертантом нуклеотидных последовательностей риккетсий (около 1500), из которых 159 депонировано в международную электронную базу данных GenBank.

По материалам диссертации опубликовано 6 научных статей, из них 5 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus с высоким для данной отрасли науки импакт-фактором (Q1), одна статья - в российском рецензируемом журнале списка ВАК. Результаты данного исследования докладывались на научных конференциях различного уровня, в том числе двух международных, и известны широкой научной общественности.

Диссертационная работа соответствует формуле специальности 03.01.03 – молекулярная биология, так как в ней исследуется генетическая изменчивость риккетсий на основе анализа структуры нескольких, наиболее важных с точки зрения установления таксономии генов (16S рРНК, цитратсинтазы *glcA*, поверхностных белков *ompA*, *ompB* и *sca4*).

Работа выполнена диссертантом лично, изложенные в работе выводы достоверны, подкрепляются достаточным количеством экспериментального материала, его корректным анализом и обработкой.

В процессе рецензирования диссертационной работы возникли некоторые замечания, рекомендации и вопросы:

1. Обзор литературы слишком объемен (около 1\3 диссертации) и содержит описание некоторых аспектов, не касающихся напрямую темы исследования. Например, п. 1.6. Иммуитет при риккетсиозах, п. 1.7.1. Риккетсии и риккетсиозы группы сыпного тифа. Учитывая, что диссертационная работа выполняется в рамках специальности 03.01.03 - молекулярная биология, на мой взгляд, лучше было бы сократить текст и сделать акцент на возможностях и недостатках использования различных генов в качестве мишеней для идентификации и внутривидовой дифференциации риккетсий КПЛ, показать области их оптимального применения среди представителей рода *Rickettsia*. Это описание позволило бы снять вопросы о чрезвычайной краткости изложения подглавы 3.1.

2. Обращает на себя внимание Рис. 1-11, на котором представлена карта распространения риккетсий, переносимых клещами, на территории РФ, составленная диссертантом на основании анализа научной литературы. В соответствии с этой картой к наименее исследованным в отношении риккетсий группы КПЛ регионам относится Восточная Сибирь, однако ее территория не вошла в исследование. Чем объясняется выбор регионов для исследования?

3. На мой взгляд, подраздел 3.1 изложен слишком кратко. Не описан ход работы по выбору праймеров, не приведены пояснения, почему тот или иной ген или комплекс генов выбран в качестве основы для разработки праймеров разной специфичности в отношении *Rickettsia* spp. Не подчеркнута, в чем состоит новизна предложенной методики по сравнению с ранее использовавшимися подходами, ее возможности для дифференциации разных видов риккетсий.

4. В главе 3 хотелось бы увидеть итоговую таблицу, объединяющую результаты исследования по двум регионам, которая бы более наглядно продемонстрировала ассоциативную связь разных видов риккетсий с определенными видами иксодовых клещей.

5. В тексте диссертации имеются незначительные опечатки.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и несколько не умаляют достоинств работы.

Автореферат диссертации соответствует содержанию диссертации.

Заключение. Диссертация Яны Петровны Иголкиной «Молекулярно-генетический анализ риккетсий, циркулирующих на территории Западной

Сибири и Дальнего Востока» представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение важной задачи по получению новых систематизированных данных о распространении и генетической вариабельности риккетсий, инфицирующих популяции иксодовых клещей на территории азиатской части России. Полученные диссертантом результаты имеют существенное фундаментальное значение не только для развития молекулярной биологии, но и других отраслей биологических и медицинских наук, таких как микробиология, паразитология, экология, инфектология и др.

Таким образом, диссертационная работа Яны Петровны Иголкиной по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, 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, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент: _____ И.В. Козлова

Козлова Ирина Валерьевна
Иркутск 664003, ул. Тимирязева – 16,
Тел: 8 (3952) 20-76-36, diwerhoz@rambler.ru.
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Научный центр
проблем здоровья семьи и репродукции человека»
(ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ), руководитель лаборатории
молекулярной эпидемиологии и генетической
диагностики, д.м.н.
4 июня 2019 г.

Подпись Козловой И.В. удостоверяю,
специалист по кадрам ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ

О.Н. Макарова

