

## ОТЗЫВ

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

Актуальность и новизна диссертационной работы связана с тем, что она направлена на исследование важнейшей инфекционной патологии человека. Риккетсиозы чрезвычайно широко распространены и играют важную роль среди бактериальных клещевых инфекций человека. Возбудители риккетсиозов – бактерии, относящиеся к роду *Rickettsia*, выявляются в клещах во многих исследованных регионах страны, и уровень инфицированности может в некоторых видах клещей превышать 70%. При этом, ежегодно, в России более 500 тысяч человек обращаются за оказанием медицинской помощи после укуса клеща. В данных случаях необходимо решать практические вопросы по диагностике клещевых инфекций, включая риккетсиозы, и проведения комплекса профилактических мер по предотвращению развития заболеваний.

Данные о распространении различных видов риккетсий и их возможной значимости в развитии заболеваний человека весьма ограничены. Диссертационная работа направлена на получение новых данных о распространении и патогенности циркулирующих в РФ риккетсий, о клинических проявлениях клещевых риккетсиозов. Представляется крайне актуальным проведение разработки и адаптации молекулярно-генетических методов для дифференциации разных видов риккетсий, циркулирующих на территории азиатской части России. Работа посвящена совершенствованию диагностики заболеваний, вызываемых риккетсиями.

Все выше сказанное позволяет рассматривать диссертационную работу как пионерское исследование, обладающее крайне высокой научной значимостью, новизной и большой практической значимостью.

Диссертация Иголкиной Я.П. написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, главы с описанием полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка публикаций и списка использованной литературы. Во введении четко определены актуальность проблемы, цели и задачи работы, научная новизна и практическая ценность полученных результатов, а также положения, выносимые автором на защиту. Обзор написан подробно, ясно и логично. Раздел материалы и методы свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии по определению и анализу геномных последовательностей инфекционных патогенов и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа. Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в главе 3 разбитой на восемь подразделов. Результаты представлены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов. Обсуждение результатов диссертационной работы проведено достаточно полно.

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные задачи:

- Разработка методологии для выявления ДНК риккетсий и их идентификации методами ПЦР;
- Проведение оценки распространения и генетического разнообразия риккетсий в клещах различных видов, собранных на территории Западной Сибири и Дальнего Востока;
- Оценка видового и генетического разнообразия риккетсий в клещах рода *Ixodes* на юге Западной Сибири;
- Изучение видовой принадлежности и генетической variability риккетсий в клинических образцах от пациентов.

В рамках настоящей работы на основе анализа оригинальных нуклеотидных последовательностей различных видов риккетсий была исследована генетическая variability современных вариантов данного патогена, циркулирующих на территории северной Евразии. Был исследован громадный объем

экспериментального материала: проанализировано более 3849 клещей родов *Ixodes*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis*, собранных на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, а также клинические образцы от 604 пациентов из Западной Сибири на наличие ДНК *Rickettsia* spp.. Была показана ассоциация между определенным видом риккетсий и видом клеща. Установлено, что клещи *I. persulcatus* в большинстве исследованных регионов наиболее часто инфицированы “*Candidatus R. tarasevichiae*”, а на острове Сахалин – *R. helvetica*. На наличие риккетсий впервые были исследованы клещи *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*. В *I. trianguliceps* был выявлен и генетически охарактеризован новый кандидатный вид риккетсий из группы КПЛ - “*Candidatus R. uralica*”.

В клещах *I. apronophorus* была обнаружена ДНК “*Candidatus R. tarasevichiae*” и *R. helvetica*. Исследование клещей *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*, обитающих в области симпатрии этих трех видов, показало, что снятые с грызунов клещи *I. persulcatus* были наиболее часто инфицированы “*Candidatus R. tarasevichiae*”, клещи *I. apronophorus* – *Rickettsia helvetica*), а клещи *I. trianguliceps* – “*Candidatus R. uralica*”. В клещах *I. trianguliceps* и *I. apronophorus* были выявлены два новых генетических варианта *R. helvetica*, отличающихся от геноварианта *R. helvetica*, обнаруженного в клещах *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их гибридах на территории Западной Сибири и Дальнего Востока. Гены 16S рРНК и поверхностных белков риккетсий “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*” были охарактеризованы с целью уточнения таксономической идентификации этих кандидатных видов риккетсий.

При анализе клинических образцов госпитализированных пациентов была выявлена ДНК не только *R. sibirica*, но и *R. raoultii*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. aeschlimannii*, *R. slovaca* и новых генетических вариантов *Rickettsia* spp., не относящихся к известным видам. У большинства пациентов, в образцах которых была выявлена ДНК *R. sibirica*, наблюдались типичные для риккетсиозов клинические проявления заболевания. Также описаны не типичные клинические проявления для риккетсиозов, вызываемых другими видами риккетсий.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:



- Разработка методологии проведения родо - и видоспецифичной ПЦР, для выявления ДНК риккетсий и идентификации наиболее распространенных на территории азиатской части России видов риккетсий;
- Проведение широкомасштабного исследования иксодовых клещей разных видов, обитающих на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, на наличие генетического материала ДНК риккетсий;
- Изучение распространения и генетического разнообразия риккетсий в клещах *I. trianguliceps*, *I. apronophorus* и *I. persulcatus*;
- Обнаружение ранее неизвестных риккетсий, которые были охарактеризованы генетически и на основании критериев для описания новых видов причислены к потенциально новому виду "*Candidatus Rickettsia uralica*", который преимущественно выявляется в клещах *I. trianguliceps*;
- Генетическая характеристика по нескольким генам двух кандидатных видов риккетсий: "*Candidatus Rickettsia principis*" и "*Candidatus Rickettsia rara*" и подтверждение их статуса как новых видов риккетсий;
- Выявление в клещах рода *Haemaphysalis* ДНК *Rickettsia canadensis* и *Rickettsia aeschlimannii* в азиатской части России;
- Детекция в образцах пациентов ДНК *R. raoultii*, "*Candidatus R. tarasevichiae*", *Rickettsia slovacae*, *R. aeschlimannii*, а также новых геновариантов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Иголкиной Яны Петровны является самостоятельным законченным исследованием, посвященным крайне актуальной проблеме изучения генетического разнообразия риккетсий на территории азиатской части России, установления их роли в инфекционной патологии человека и созданием фундаментальной основы для совершенствования их генетической диагностики. Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- Не совсем согласен с трактовкой автором практической значимости работы. Вне всякого сомнения, диссертант скромно оценивает возможную практическую значимость полученных результатов. На мой

взгляд, депонирование новых, секвенированных автором, последовательностей *Rickettsia* spp. и развитие методологии ПЦР анализа имеет громадное практическое значение. Это особенно важно для совершенствования генетической диагностики в северной Евразии и проведения таксономической идентификации *Rickettsia* spp. в экспериментальных и полевых пробах. Было бы весьма полезно расширить описание этих результатов, вплоть до формулировки рекомендаций по практическому использованию этих результатов.

- Имеются небольшие редакционные замечания. Так, например, выражение «в образцах пациента» раздел 3.5. Видимо, следует более конкретно уточнить о каких образцах (кровь, биоптаты и т.д.) идет речь. Также не совсем удачно название работы. Видимо, следует ввести дополнительно слово, однокорневое со словом «клещ». В целом, количество редакционных неточностей совершенно незначительно для текстов такого объема и сложности. Диссертация хорошо читается, написана очень профессионально.

На мой взгляд, для достижения результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-генетических методов исследования биоразнообразия риккетсий и методологии выявления и генотипирования риккетсий в различных типах образцов, включая клинический материал от пациентов. Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам. Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 132 страницах, содержит 22 рисунка и 17 таблиц. Список литературы состоит из 173 ссылки на работы отечественных и зарубежных авторов.

Полученные результаты были успешно апробированы на 7 российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 6 статей из них 5 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of

Science и Scopus, и 1 в российском рецензируемом журнале. Принципиально важно отметить, что в ходе работы были секвенированы приблизительно 1500 нуклеотидных последовательностей различных видов риккетсий. 159 последовательностей были депонированы в базе данных GenBank и доступны всем исследователям для совершенствования методов генетической диагностики и дальнейшего изучения генетического разнообразия риккетсий.

### **Заключение**

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Фундаментальный характер работы обосновывается получением совокупности новых данных по нуклеотидным последовательностям различных видов риккетсий, проведением филогенетических исследований секвенированных нуклеотидных последовательностей, проведением генотипирования различных изолятов риккетсий, разработкой таксономических критериев для характеристики новых видов риккетсий на основе полученной генетической информации. Практическая значимость работы связана с разработкой методологии ПЦР диагностики для выявления генетической информации риккетсий в различных полевых пробах и у больных с подозрением на клещевые инфекции, обнаружением новых кандидатных видов риккетсий, получением информации о филогеографии различных видов риккетсий и их взаимосвязи с различными видами клещей. Очень важный аспект исследования связан с расшифровкой роли риккетсий в развитии новых риккетсиозов у человека, в выявлении новых случаев заболевания. Представляется, что диссертационная работа закладывает фундаментальные основы для развития дальнейших исследований клещевых инфекций, совершенствования методов диагностики и мониторинга клещевых инфекций у человека.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Иголкина Я.П. «Молекулярно-генетический анализ риккетсий, циркулирующих на территории Западной Сибири и Дальнего Востока» дает все основания считать, что диссертационная работа



