

ОТЗЫВ

официального оппонента Локтева В.Б. на диссертационную работу в виде научного доклада **Рар Веры Александровны «Молекулярно-генетический анализ инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами на территории азиатской части России»** представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность исследования

Актуальность и новизна диссертационной работы связана с тем, что она направлена на исследование бактериальных и протозойных клещевых инфекционных агентов, вызывающих заболевания у животных и людей после укуса клеща. Особая актуальность данной работы связана с отсутствием данных по комплексному исследованию природных очагов, находящихся в областях совместного обитания нескольких видов клещей, с недостаточной изученностью возбудителей клещевых инфекционных заболеваний у пациентов с нетипичной симптоматикой и с отсутствием современных и полных данных по геномике переносимых клещами бактериальных и протозойных инфекционных агентов.

Совокупность полученных диссертантом результатов во многом закрывает дефицит наших знаний в области исследования клещевых инфекций бактериальной и протозойной природы. Полученные знания станут основой для развития генетической диагностики, создания новых лечебных препаратов и средств профилактики, возможно включая новые поколения вакцин. Совершенно очевидно, что именно это может позволить сохранить здоровье и жизнь населения, проживающего в эндемичных по клещевым инфекциям районах нашей страны.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Пар В.А. представлена в виде научного доклада и сопровождающего ее автореферата. В связи с этим обзор литературы и подробное описание экспериментальных методов в диссертационной работе отсутствуют. Фактически эти разделы должным образом описаны в соответствующих публикациях автора по теме диссертации. Автореферат хорошо структурирован и состоит из общей характеристики работы, описания содержания работы, заключения, выводов и списка публикаций. Автореферат изложен на 60 страницах, содержит 13 таблиц и проиллюстрирован 22 рисунками.

Целью диссертационной работы было решение большой научной проблемы, связанной с изучением биоразнообразия бактериальных и протозойных инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами на территории Азиатской части РФ, установление ассоциации инфекционных агентов с различными видами иксодовых клещей и резервуарных хозяев, а также изучение вклада различных инфекционных агентов в патогенез инфекций, переносимых клещами.

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

- Изучение генетических маркеров характерных для клещей рода *Ixodes*, распространенных в местах совместного обитания нескольких видов клещей: *I. persulcatus* / *I. pavlovskyi*, а также *I. apronophorus* / *I. persulcatus* / *I. trianguliceps* на территории азиатской части страны.
- Характеризация молекулярно-генетическими методами биоразнообразия боррелий, риккетсий, бабезий, тейлерий и анаплазм ассоциированных с различными видами клещей и способных вызывать заболевания у животных и человека.

- Особое внимание диссертантом было обращено на решение проблемы таксономической классификации новых и впервые выявленных вариантов вышеуказанных инфекционных агентов.

Собственно, описание работы разбито на основные части посвящённые определению видовой принадлежности и генетической характеристике иксодовых клещей, молекулярно-генетическому анализу боррелий и изучение их ассоциации с различными видами клещей и позвоночных хозяев, молекулярно-генетическому анализу риккетсий, оценке биоразнообразия бактерий семейства *Anaplasmataceae* и простейших гемопаразитов *Babesia* spp. и *Theileria* spp. Полученные результаты основаны на большом фактическом материале, который включает более 6300 клещей, образцы от 2200 мелких млекопитающих и 2300 домашних и сельскохозяйственных животных, а также в клинических образцах от 1281 пациентов. Это позволило выявить 30 известных и новых видов инфекционных агентов. Важно отметить, что три вида были впервые обнаружены в России, а восемь видов - впервые идентифицированы в азиатской части России. Были также обнаружены новые геноварианты анаплазм и бабезий, которые таксономически не кластеризуются с известными видами. Более тысячи нуклеотидных последовательностей депонировано в базу данных GenBank.

Основные разделы работы посвящены: определению видовой принадлежности клещей в областях симпатрии *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*; оценки видовой принадлежности и генетической характеристики клещей в областях симпатрии *I. persulcatus*, *I. trianguliceps* и *I. apronophorus*; исследованию видового и генетического разнообразия риккетсий в клещах *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *I. apronophorus* и *I. trianguliceps*; с особым вниманием к генетической гетерогенности популяции *R. raoultii* и *R. helvetica*; выявлению новых

возбудителей риккетсиозов в Западной Сибири; определению генетического разнообразия бактерий семейства Anaplasmataceae; изучению генетического разнообразия боррелий и оценки генетического разнообразия простейших гемопаразитов *Babesia* spp. и *Theileria* spp.. Отдельный подраздел посвящен генотипированию *Babesia* spp. и *Theileria* spp. в домашних и сельскохозяйственных животных. Результаты обсуждаются в заключении и далее формулируются основные выводы работы. Раздел выводы написан очень тщательно и включает в себя 13 выводов, иллюстрирующих достижение целей диссертационной работы.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Разработан комплекс молекулярно-генетических методик, позволяющих определять видовую принадлежность клещей рода *Ixodes* и переносимых иксодовыми клещами инфекционных агентов.
- Идентифицировано и генотипировано не менее 30 клещевых инфекционных агентов, относящихся к родам *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Borrelia*, *Babesia* и *Theileria*, потенциально способных вызвать заболевание животных и человека. Впервые обнаружены в Сибири и на Дальнем Востоке *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia slovaca*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma marginale*, *Babesia divergens*, *Babesia venatorum*, *Babesia canis*, *Babesia caballi* и *Theileria equi*. Также выявлено и охарактеризовано три новых вида: “*Candidatus Borrelia sibirica*”, “*Candidatus Rickettsia uralica*” и “*Candidatus Ehrlichia khabarensis*”:
- Показано существование в Западной Сибири и на Дальнем Востоке устойчивых природных очагов клещевых патогенов, сформированных с участием *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и их фертильных межвидовых гибридов.
- Обнаружена ассоциация между разными видами/родами клещей и разными видами риккетсий. Так “*Candidatus R.*

tarasevichiae” наиболее часто выявлялись в *I. persulcatus*, *R. raoultii* и *R. sibirica* – в клещах рода *Dermacentor*, а *Rickettsia heilongjiangensis*, “*Candidatus R. rara*” и “*Candidatus R. principis*” - в *Haemaphysalis* spp.. Причем наиболее высокое видовое разнообразие риккетсий наблюдалось на Дальнем Востоке, где были обнаружены уникальные для азиатской части России риккетсии: *R. canadensis*, *R. aeschlimannii*, “*Candidatus R. mendelii*”, “*Candidatus R. principis*” и “*Candidatus R. rara*”. Доказано, что “*Candidatus R. mendelii*” формирует отдельную базальную группу риккетсий.

- Выявлено широкое распространение боррелиозов, вызванных *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* на территории Западной Сибири.

- Показано широкое распространение анаплазмозов крупного и мелкого рогатого скота в Сибири. Установлено, что единственным этиологическим агентом анаплазмоза у коз и овец является *A. ovis*, в то время как анаплазмоз КРС может быть вызван двумя видами внутриэритроцитарных анаплазм - *A. marginale isolate* sp. Omsk и *Anaplasma* sp. Sib122, и в единичных случаях моноцитарными анаплазмами *A. bovis*.

- Обнаружены потенциально патогенные для людей *Babesia microti* (US-type), *Babesia divergens* и *Babesia venatorum*; возбудители пироплазмоза собак (*Babesia canis*) и лошадей (*Babesia caballi*). При этом обнаружено 12 новых геновариантов бабезий, генетически схожих с пироплазмами хищников и пироплазмами жвачных животных.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Пар Веры Александровны является самостоятельным законченным исследованием, посвященным решению проблемы комплексного молекулярно-генетического исследования бактериальных и протозойных инфекционных агентов,

переносимых иксодовыми клещами на территории азиатской части России. Работа выполнена с привлечением громадного объёма экспериментального материала. Выявлено и генетически охарактеризовано не менее 30 видов клещевых инфекционных агентов: боррелий (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. miyamotoi*), риккетсий (*R. raoultii*, *R. sibirica*, “*Candidatus R. tarasevichiae*”, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. canadensis*, *R. slovaca*, “*Candidatus R. mendelii*”), анаплазм (*A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. marginale*), эрлихий (*E. muris*), неоэрлихий (*N. mikurensis*), бабезий (*Bab. microti*, *Bab. divergens*, *Bab. venatorum*, *Bab. canis*, *Bab. caballi*) и тейлерий (*T. equi*). Такие инфекционные агенты как *R. canadensis*, *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, “*Candidatus R. mendelii*”, *A. ovis*, *A. marginale*, *Bab. divergens*, *Bab. venatorum*, *Bab. canis*, *Bab. caballi* и *T. equi* были впервые идентифицированы в Азиатской части России.

В целом поставленные в работе задачи решены, выносимые на защиту положения хорошо аргументированы. Диссертантом проведена большая и объёмная работа, ее результаты должным образом опубликованы и отражены в научном докладе и автореферате. Предложены перспективы дальнейшего развития исследований по исследованным проблемам. Это необходимость широкого использования молекулярно-генетических методов для дифференциальной и быстрой диагностики клещевых инфекций у пациентов с последующим назначением эффективной антибиотикотерапии. Данный подход может позволить проводить эффективную профилактику этой группы клещевых инфекций у человека после контакта с иксодовыми клещами.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-биологических

методов исследования в сочетании с современными биоинформатическими методами для анализа полученных массивов последовательностей инфекционных агентов. 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.

Полученные результаты были апробированы на различных российских и международных конференциях и конгрессах. По теме диссертации опубликовано 33 научных статей в отечественных и международных высокорейтинговых журналах индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ. Полученные нуклеотидные последовательности инфекционных агентов депонированы в международной базе данных GenBank и доступны для всех исследователей.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Работа выполнена в очень актуальной области исследований и вносит очень существенный вклад в понимание основных закономерностей биоразнообразия бактериальных и протозойных инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами на территории Азиатской части РФ, установления ассоциации инфекционных агентов с различными видами иксодовых клещей и резервуарных хозяев, изучения вклада различных агентов в патогенез клещевых инфекций у человека. Научная новизна и практическая значимость полученных результатов не вызывает сомнений. Ведь только на территории нашей страны за медицинской помощью после укуса клеща обращается до полумиллиона человек. Для всех этих пациентов необходимо экстренное проведение диагностики клещевых инфекций,

проведение профилактического лечения, и в случае необходимости оказание полноценной медицинской помощи.

Это утверждение и высокая научно-практическая значимость полученных результатов подтверждается уровнем цитирования некоторых основных публикаций по теме диссертационной работы в базах данных WoS и Scopus. Оценить значимость, определённых диссертантом, нуклеотидных последовательностей инфекционных агентов затруднительно из-за отсутствия системы регистрации использования (реферирования) этих последовательностей. Однако очевидно, что эти нуклеотидные последовательности могут широко использоваться для конструирования тест систем для генетической диагностики клещевых инфекций в современных условиях.

Замечания по диссертационной работе

Представленная работа не лишена определенных недостатков. Замечания, которые можно сделать, немногочисленны и во многом вызваны формой представления диссертационной работы в виде научного доклада, неизбежно менее детального, чем диссертационная работа традиционного вида. В основном они представлены редакционными замечаниями.

К ним следует отнести:

- Встречаются отдельные редакционные неточности и неудачные выражения. Например: стр. 6 - «кластерам *Babesia* spp. хищных» видимо следует хищников; стр. 57 - «клещах в природном очаге дальневосточного клещевого риккетсиоза в Хабаровском крае.». Вероятно, в Хабаровском крае существует множество очагов. Следует видимо использовать множественное число или конкретное название природного очага. В целом, количество этих неточностей невелико и не влияет на восприятие текста.

- Рисунки 9В и 11 безусловно, выиграли бы от внесения номеров GenBank использованных для построения дендрограмм последовательностей в сам рисунок или в подписи к нему.

Эти недостатки не снижают научной значимости диссертационной работы и, оценивая работу в целом, можно сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Ряд статей, опубликованных в таких журналах как Ticks and Tick-borne Diseases; Emerging Infectious Diseases; Infection, Genetics and Evolution стали фактически классическими для этой области исследований. Высокий уровень международного цитирования основных публикаций диссертационной работы дополнительно подтверждает значимость и востребованность диссертационной работы.

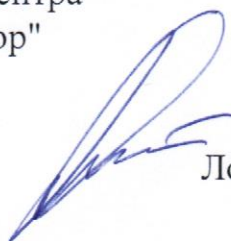
Заключение

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Представляется, что диссертационная работа закладывает фундаментальные основы для решения проблемы клещевых инфекций человека в РФ, для развития дальнейших фундаментальных исследований в этой области и разработки средств диагностики и профилактики клещевых инфекций животных и человека, что может существенно улучшить состояние здоровья населения нашей страны.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Рар В.А. «Молекулярно-генетический анализ инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами на территории азиатской части России», дает все основания считать, что диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.3 – молекулярной биология и полностью соответствует требованиям

критериев пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук. Диссертационная работа в виде научного доклада оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Пар Вера Александровна, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией, главный научный сотрудник,
ФБУН Государственного научного центра
вирусологии и биотехнологии "Вектор"
Роспотребнадзора,
доктор биологических наук,
профессор
Тел: +7(913) 98 72 541
Эл. адрес: loktev@vector.nsc.ru



Локтев Валерий Борисович

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Роспотребнадзора.
Адрес: 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Тел: (383) 363-74-10
Факс: (383) 363-47-14
Эл. адрес: vector@vector.nsc.ru

Подпись Локтева Валерия Борисовича заверяю:
Врио ученого секретаря ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,

«_____» января 2024 г.



О.В. Прыткова