



Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

Федеральное казённое учреждение здраво-
охранения «Ставропольский научно-
исследовательский противочумный институт»

Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

(ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора)

355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д.13-15

Тел/факс: (865-2) 26-03-12

E-mail: snipchi@mail.stv.ru

ОКПО 01897080 ОГРН 1022601949930

ИНН 2636000641 КПП 263601001

28.04.2017 № 03-07-746

на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспо-
требнадзора
А.Н. Куличенко



« _____ » 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации
НОСОВА Никиты Юрьевича на тему: «Филогенетический анализ и диффе-
ренциация штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность избранной темы. Особо опасная инфекция чума, природные очаги которой существуют на всех континентах, за исключением Австралии и Антарктики, в исторической ретроспективе вызывала опустошительные пандемии и в наше время дает о себе знать проявлениями эпизоотической активности, сопровождающимися заболеваниями людей. В последние три года после трех с половиной десятилетий отсутствия заболеваний в РФ, на Алтае зарегистрированы случаи заражения людей. Поскольку многие очаги чумы локализуются в приграничных областях нескольких государств, весьма вероятен трансграничный занос инфекции на территорию России. Эти обстоятельства диктуют необходимость мониторинга за возбудителем чумы, поиск генетических маркеров и методов, обеспечивающих дифференциацию штаммов, циркулирующих в разных природных очагах на разных географических территориях. Нельзя также недооценивать потенциал использования *Y. pestis* в качестве агента биологического оружия и терроризма, в ситуациях, когда определение происхождения штамма становится чрезвычайно важным. Филогенетический анализ штаммов возбудителя чумы позволяет достоверно определять степень родства изолятов и на этой основе их различать. Штаммы

средневекового биовара с высокой вирулентностью и эпидемической значимостью имеют наибольшее распространение в очагах чумы РФ и стран СНГ, однако их исследованию посвящено незначительное количество работ, их филогенетическая принадлежность остается мало исследованной. В то время как разработан способ дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара от штаммов других биоваров и подвидов, а также способ разделения типичных и атипичных штаммов этого биовара, отсутствуют способы, позволяющие проводить дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогенетической и географической (очаговой) принадлежности. В связи с этим, тема диссертационной работы Носова Н.Ю., цель которой – филогенетический анализ и разработка способов дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации, других стран СНГ и ближнего зарубежья – является вполне актуальной.

Связь работы с планами соответствующих отраслей науки. Работа выполнена в рамках 2-х плановых научно-исследовательских тем «Комплексный эколого-эволюционный анализ штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов Российской Федерации и сопредельных стран» 2014-2016 гг. (шифр темы 50-3-14, № гос. регистрации 0120.1450347), «Полногеномное секвенирование референтных последовательностей штаммов и совершенствование молекулярной идентификации штаммов возбудителя чумы из очагов Российской Федерации и сопредельных государств» 2016-2018 гг. (шифр темы 65-3-16, № гос. регистрации (АААА-А16-116112810061-0).

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Результаты диссертационного исследования, выводы и рекомендации характеризуются существенной новизной. Определена современная популяционная структура средневекового биовара возбудителя чумы, основанная на данных полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы РФ, других стран СНГ и зарубежных штаммов. Установлено, что штаммы средневекового биовара, широко распространенные в очагах чумы в РФ и СНГ, а также в Монголии, за исключением штаммов из Центрально-Кавказского высокогорного очага в РФ, принадлежат к одной ветви средневекового биовара. В составе филогенетической ветви 2.MED1 выявлено наличие двух основных ветвей: Кавказско-Каспийской и Среднеазиатско-Китайской. Разработан алгоритм биоинформационного анализа полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* с использованием доступных компьютерных программ. Выявлены две маркерные для филогенетических ветвей 2.MED1 и .MED3 делеции, на основе которых впервые разработан способ дифференциации средневековых

штаммов по принадлежности к филогенетическим ветвям 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР. Впервые найдены маркерные SNPs для штаммов *Y. pestis* из 5 природных очагов чумы. Разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* средневекового биовара к пяти природным очагам чумы в РФ с помощью метода SNP типирования. Получены MLVA25 генотипы штаммов *Y. pestis* из 32 очагов РФ и других стран СНГ. В программе Bionumerics 7.6 создана база данных MLVA25 генотипов 54 штаммов, позволяющая устанавливать очаговую принадлежность штаммов *Y. pestis*, которую следует рекомендовать к использованию в практической работе противочумных учреждений РФ.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов. Полученные знания открывают перспективу для исследования направлений эволюции штаммов *Y. pestis* средневекового биовара и преобразований их генома, связанных с адаптацией к существованию в условиях различных биоценозов природных очагов чумы в ландшафтах степей, полупустынь и пустынь, исторических путей формирования современных границ распространения штаммов средневекового биовара.

Практическое значение имеют разработанные способы дифференциации штаммов средневекового биовара с помощью методов ПЦР - SNP -, MLVA25 анализа и полногеномного секвенирования, база данных MLVA25 генотипов штаммов *Y. pestis*, которые могут быть использованы для повышения эффективности эпидемиологического мониторинга, проводимого в очагах РФ и стран СНГ. По материалам работы составлены и утверждены учрежденческим уровнем внедрения методические рекомендации «Определение подвидовой, биоварной и очаговой принадлежности штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов России и сопредельных стран СНГ методом MLVA25 анализа» и «Алгоритм построения филогенетических деревьев штаммов *Yersinia pestis* по данным полногеномного SNP анализа». В базу данных NCBI GenBank депонированы полногеномные последовательности 12 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из очагов РФ и других стран СНГ. Полученные данные включены в лекции курсов специализации, а также в материалы монографии «Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья с 1876 по 2016 гг.».

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Основные положения диссертации и выводы соответствуют задачам исследования и базируются на авторских данных, изложенных в контексте современных представлений о филогении чумного микроба. Полученные

данные представляются убедительными, а научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, являются вполне обоснованными. Достоверность материалов диссертации подтверждена достаточным количеством исследованных штаммов (142 штамма чумного микроба, выделенных в природных очагах чумы в РФ, Закавказье, Средней Азии, Китая, Монголии, Индии, Шри-Ланки и Вьетнама), экспериментальными данными и результатами их обработки в современных компьютерных программах.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению. Диссертация написана по традиционному плану.

Во введении кратко охарактеризованы проблема чумы в настоящее время, классификация штаммов ее возбудителя, средневековый биовар и подходы к дифференциации штаммов внутри этого биовара, подчеркнуты возможности полногеномного секвенирования в анализе популяционной структуры средневекового биовара и разработки новых способов дифференциации штаммов. Обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, отражены научно-практическая значимость, новизна полученных результатов. Четко сформулированы цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, отражены научно-практическая значимость, новизна полученных результатов.

Обзор литературы освещает современную популяционную структуру, филогенетический анализ и молекулярное типирование штаммов *Y. pestis*. Выделены внутривидовое разнообразие и исторические схемы классификации *Y. pestis*, формирование представлений о современном филогенетическом разнообразии *Y. pestis*, современная популяционная структура и филогенетическое разнообразие *Y. pestis*, методы типирования возбудителя чумы. В целом обзор дает хорошее представление о предмете исследования и завершается обоснованным выводом об актуальности изучения популяционной структуры штаммов средневекового биовара *Y. pestis*, а также разработки способов их внутрибиоварной дифференциации и молекулярного типирования с применением наиболее современных молекулярно-генетических и биоинформационных методов.

В главе 2 «Материалы и методы» дано описание использованных в работе штаммов *Y. pestis*, питательных сред, методов исследования культурально-морфологических и биохимических свойств чумного микроба, молекулярно-генетических методов и биоинформационных программ, свидетельствующее о внушительном современном методическом арсенале, которым располагает автор диссертации.

Глава 3 «Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России, других стран СНГ и ближнего зарубежья» обосновывает выбор референтных штаммов для исследования, метода полногеномного секвенирования и доступных биоинформационных программ, отвечающих задаче раздела. Выбрав анализ на основе выявления полиморфизма SNPs в кóровой (общей для всех сравниваемых штаммов) нуклеотидной последовательности генома, автор описывает биоинформационный алгоритм для исследования филогении *Y. pestis* на этой основе, состоящий из 4 последовательных этапов.

С использованием этого алгоритма определена современная популяционная структура *Y. pestis* и предложена усовершенствованная внутривидовая классификация штаммов возбудителя чумы.

Завершает главу 3 анализ популяционной структуры средневекового биовара, в результате которого установлено наличие большого числа филогенетических ветвей, соответствующих географическим регионам и периодам их выделения штаммов возбудителя. Получены полногеномные последовательности штаммов средневекового биовара, референтные для всех очагов России и большинства стран СНГ, которые могут быть использованы для поиска отличий в строении их геномов для разработки способов внутрибиоварной дифференциации средневековых штаммов по их филогенетической и очаговой принадлежности с помощью методов ПЦР и SNP типирования. Этому посвящена следующая глава диссертации.

В главе 4 проведен анализ особенностей организации генома штаммов средневекового биовара, обнаруживший делецию в 33 т.п.н., характерную для штаммов филогенетической линии 2.MED1, и делецию размером в 73 п.н., специфическую для штаммов линии 2.MED3. На основе этих двух мишеней разработан способ дифференциации средневековых штаммов ветвей 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. С добавлением в схему исследования еще 2-х ранее предложенных мишеней стало возможным дифференцировать как штаммы средневекового биовара от других биоваров, так и штаммы 4-х линий внутри биовара.

Секвенирование ПЦР продуктов позволило также определить маркерные SNP для 5 природных очагов чумы на территории РФ и на этой основе дифференцировать выделенные в них штаммы.

Глава 5 посвящена дифференциации штаммов *Y. pestis* из природных очагов РФ и стран ближнего зарубежья методом MLVA. Использование этого метода по схеме MLVA25 позволило провести дискриминацию генетически однородных штаммов, которые не удалось разделить с помощью полно-

геномного SNP анализа. Автором подтверждена возможность применения для быстрого сравнительного анализа сокращенной схемы MLVA7. Отметив необходимость для получения желаемых результатов наличия репрезентативной базы MLVA генотипов штаммов, диссертант впервые создает базу данных с MLVA25 генотипами 54 штаммов из 32 очагов чумы РФ, СНГ и ближнего зарубежья.

Заключение диссертации подводит итоги филогенетического анализа и разработки способов дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара и подтверждает достижение цели исследования.

Выводы диссертации отражают полученные результаты, аргументированы и научны.

Диссертацию отличает системность подхода и последовательность решения задач, информативность содержания и хорошая иллюстрированность рисунками и таблицами.

В качестве замечания можно отметить, что для большей объективности сравнения дискриминирующих возможностей предлагаемых схем генотипирования можно было бы привести индекс разнообразия Хантера-Гастона HGDI для каждой из них. По тексту встречаются некоторые опечатки. Впрочем, эти замечания не умаляют достоинств работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат диссертации полностью соответствует основным положениям диссертации.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. Основные результаты диссертации изложены в 11 печатных работ, из них 4 – в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России».

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Таким образом, диссертация Носова Никиты Юрьевича является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи филогенетического анализа и разработки способов дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, имеющей существенное значение для микробиологии особо опасных инфекций, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Отзыв обсужден на межлабораторной конференции лаборатории сибирской язвы, лаборатории природно-очаговых инфекций и лаборатории биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 17.04.2017 г., протокол № 2.

Главный научный сотрудник
лаборатории сибирской язвы, д.м.н.,
профессор Еременко Евгений Иванович

Заведующая лабораторией подготовки специалистов
д.м.н., Таран Татьяна Викторовна

Подписи Еременко Е.И. и Таран Т.В. заверяю
начальник отдела кадров В.В. Демченко

