

ОТЗЫВ

**на автореферат диссертации Никифорова Константина Алексеевича
«Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-
генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*»,
представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук
по специальности 1.5.11. – «Микробиология»**

Изменение границ и активности природных очагов чумы, опасность заноса высоковирулентных штаммов возбудителя с территорий трансграничных очагов, интенсивные миграционные, туристические межгосударственные потоки населения способствуют повышению вероятности возникновения новых случаев этого заболевания и являются причиной перманентной угрозы глобального распространения инфекционных болезней. Существование в Российской Федерации природных очагов сочетанного типа, в которых циркулируют штаммы чумного микроба с различной вирулентностью и эпидемической значимостью, осложняет дифференциацию и типирование *Yersinia pestis* в рамках проводимого эпидемиологического мониторинга и определяет необходимость совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекций, включающей разработку и использование методов, основанных на современных успехах и достижениях в геномном, протеомном, биоинформационном анализе, повышении специфичности и чувствительности диагностических методик. Учитывая все вышеизложенное, исследование по разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis* по их принадлежности к определенным подвидам, биоварам и филогенетическим ветвям является актуальным и имеет большое значение при проведении эпидемиологического расследования вспышек и случаев заносов чумы. Реализации именно этого практически значимого направления и посвящена данная работа.

Автором выполнен филогенетический анализ популяционной структуры штаммов возбудителей чумы, распространенных в природных очагах России и сопредельных государств, и на основании полученных данных проведено научно-методическое обоснование, а также разработана комплексная система молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis* с целью повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы.

На большом фактическом материале автором показана научная новизна исследования:

- получены новые данные о глобальном генетическом разнообразии *Y. pestis* с учетом филогеографических популяций из природных очагов чумы России и сопредельных государств;

- разработан эффективный способ дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ и впервые обнаружена уникальная для штаммов центральноазиатского подвида мутация в гене *ybtS*, которая может быть связана с их избирательной вирулентностью;

- научно обоснована методология и разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к отдельным подветвям и кластерам алтайского биовара центральноазиатского подвида;

- впервые на основании проведенного молекулярно-генетического анализа популяционной структуры восточного биовара основного подвида *Y. pestis* из очагов чумы СРВ по данным полногеномного секвенирования выявлено наличие специфической ветви 1.ORI2v, к которой относится большинство штаммов из природных очагов чумы Вьетнама;

- на основании полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* найдены ДНК-мишени (SNPs), маркерные для различных филогенетических ветвей, и разработан комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ, позволяющих проводить внутривидовую дифференциацию всех основных филогенетических групп *Y. pestis*;

- научно обоснована и разработана комплексная система молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанная на широком использовании методов (ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ, система мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке), обеспечивающих дифференциацию подвигов и биоваров *Y. pestis* с разной эпидемической значимостью, и разработан алгоритм их применения для быстрого и надежного анализа в рамках микробиологического мониторинга в природных очагах чумы.

Теоретическая значимость заключается в усовершенствовании классификации штаммов *Y. pestis*, согласно которой выделяются семь подвигов, различных по эпидемической значимости. На основе полногеномного секвенирования определена популяционная структура древних подвигов *Y. pestis* и выявлены отличия в генах факторов патогенности; получены новые данные о генетических особенностях центральноазиатского подвида и найдены мутации в ряде генов, кодирующих факторы патогенности. Полученные данные вносят значимый вклад в определение закономерностей пространственно-временной циркуляции и

эволюции возбудителя чумы в природных очагах России, стран ближнего и дальнего зарубежья.

Практическая значимость исследования не вызывает сомнений. Реализована в виде подобранных комплектов праймеров для дифференциации основных ветвей эволюции *Y. pestis* методом аллель-специфической ПЦР-РВ для молекулярно-генетической идентификации штаммов из природных очагов чумы с определением их принадлежности к основным филогенетическим ветвям и оценки вирулентности; регистрации Роспотребнадзором в сфере здравоохранения РФ медицинских изделий для *in vitro* диагностики: «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)» для детекции ДНК штаммов *Y. pestis* в пробах биологического, клинического материала и объектов окружающей среды; «Набор реагентов для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной ПЦР в формате биочипа (Пест-ЛМ ПЦР-биочип)» для качественного выделения ДНК возбудителя чумы. В рамках Регистрационных досье указанных медицинских изделий разработаны нормативные документы – ТУ и инструкции по применению. В международной базе данных NCBI GenBank депонированы полногеномные последовательности 48 штаммов *Y. pestis*.

Достоверность выводов обоснована и подкреплена значительным объемом проведенных исследований в повторяющихся экспериментах, применением современных диагностических методов, методов компьютерного и статистического анализа.

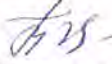
Основные результаты исследований опубликованы в 29 научных работах, в том числе 13 – в журналах, рекомендованных ВАК, 1 – в зарубежном журнале, 12 – в сборниках и материалах конференций, получено 2 патента на изобретения и зарегистрирована программа для ЭВМ. Материалы диссертации включены в коллективные монографии «Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, 2019», «Специфическая профилактика чумы: состояние и перспективы, 2012» и «Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств, 2022». Материалы диссертации неоднократно обсуждены на научных конференциях международного и федерального уровней. Автореферат написан хорошим и доступным языком, отличается четкостью и

подробностью, выводы вытекают из результатов исследования и соответствуют поставленным задачам.


Полученные в результате проведенного исследования и представленные в автореферате данные позволяют охарактеризовать диссертацию Никифорова Константина Алексеевича «Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*» как законченную научно-квалификационную работу, в которой решена важная научная проблема, имеющая значимость для обеспечения эпидемиологического благополучия по чуме на территории Российской Федерации. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.11. – «Микробиология» (медицинские науки).

По актуальности, новизне полученных данных, внедрению результатов исследований диссертационная работа К.А. Никифорова соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, от 22.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168, с изм., внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 г. №751), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а её автор несомненно заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11.- «Микробиология».

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,

доктор медицинских наук, доцент  Твердохлебова Татьяна Ивановна
Адрес: 344000, г. Ростов-на-Дону, Газетный переулок, д.119,
телефон: +7 (863) 234-91-83, E-mail: rostovniimp@rniimp.ru

Подпись Твердохлебовой Татьяны Ивановны заверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
кандидат биологических наук  Алексанина Наталья Владимировна

