

ОТЗЫВ

научного консультанта по диссертационной работе

Никифорова Константина Алексеевича на тему:

«Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*»,

представляемой на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Диссертационная работа Константина Алексеевича Никифорова выполнена в лаборатории молекулярной микробиологии Федерального казённого учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» в соответствии с плановой тематикой НИР.

Актуальность выполненного исследования обусловлена тем, что чума представляет собой особо опасную инфекцию, способную вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения. Кроме того, в некоторых природных очагах Российской Федерации периодически регистрируется эпизоотическая активность, что может привести к заболеванию чумой. На территории России расположены природные очаги сочетанного типа, в которых отмечается циркуляция штаммов разных подвигов, отличающихся по вирулентности и эпидемической значимости, что значительно осложняет дифференциацию и типирование *Y. pestis* в рамках проводимого эпидемиологического мониторинга. В настоящее время нерешёнными остаются вопросы по дифференциации многих филогеографических популяций *Y. pestis*. Ввиду разницы в вирулентности и эпидемической значимости очевидна необходимость разработки способов молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis* для повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы. Для решения этой задачи могут быть использованы современные методы молекулярной микробиологии – полимеразная цепная реакция, ДНК чипы, секвенирование.

Диссертационное исследование К.А. Никифорова посвящено разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis* для повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы.

Диссертантом проведён анализ современных данных литературы по организации генома, внутривидовому и генетическому разнообразию штаммов *Y. pestis*, современным молекулярно-генетическим методам диагностики инфекционных болезней. На основе проведенного анализа определены задачи диссертационной работы, включающие: проведение филогеографического анализа популяционной структуры кавказского, улегейского

и центральноазиатского подвидов *Y. pestis*, распространённых в природных очагах России и сопредельных государств; усовершенствование подвидовой классификации *Y. pestis* с разделением подвидов по эпидемической значимости; разработку ПЦР-системы для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов (отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида); определение филогенетического разнообразия штаммов *Y. pestis* восточного биовара основного подвида из природных очагов чумы Вьетнама; создание в виде системы мультиплексных ПЦР с гибридно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке способа индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов факторов патогенности; разработка комплекса аллель-специфических ПЦР в режиме реального времени, который обеспечивает проведение дифференциации штаммов *Y. pestis* из различных очагов чумы мира; научное обоснование и разработку комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанной на совокупности методов (ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и системе мультиплексных ПЦР с гибридно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке), обеспечивающих дифференциацию подвидов и биоваров *Y. pestis* с разной эпидемической значимостью.

Никифоровым К.А. выполнен филогеографический анализ штаммов кавказского, улегейского, центральноазиатского подвидов и отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида. Результаты этого анализа расширили представление о генетическом разнообразии возбудителя чумы. Разработаны комплекты праймеров для установления принадлежности штаммов *Y. pestis* к отдельным филогенетическим ветвям улегейского, кавказского подвида, подветвям алтайского биовара центральноазиатского подвида методом фрагментного секвенирования, а также разработан способ дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. Созданные способы могут применяться в рамках эпидемиологического мониторинга очаговых территорий, а также молекулярно-генетической экспертизы случаев чумы человека в очагах России и сопредельных страна. Также была усовершенствована внутривидовая классификация вида *Y. pestis*, в соответствии с которой выделяется семь подвидов: основной, кавказский (0.РЕ2), ангольский (0.РЕ3), центральноазиатский (0.РЕ4), улегейский (0.РЕ5), тибетский (0.РЕ7) и цинхайский (0.РЕ10). Кроме того, диссертантом были найдены мутации в генах, ассоциированных с факторами патогенности, у штаммов кавказского (*astD*, *fyuA*, *hmsF*, *hmsT*, *yopH*, *yopT*, *uscG* и *uscU*), улегейского (*uscQ*) и центральноазиатского (*ybtS*) подвидов *Y. pestis*, которые возможно являются причинами их низкого эпидемического потенциала.

Диссертантом разработан способ детекции ДНК возбудителя чумы с одновременным установлением принадлежности к основному и неосновным подвидам, а также отдельно дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ (ПЦР-тест система «ГенПест-подвид/алтай-РГФ»). МИ для *in vitro* диагностики «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» может применяться в клинической лабораторной диагностике при исследовании материала, а также при проведении эпидемиологического мониторинга природных очагов чумы. Наиболее востребован набор реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы России и Сайлюгемского природного очага Монголии.

Диссертантом проведён филогенетический анализ штаммов вьетнамских штаммов восточного биовара основного подвида, по итогу которого обнаружены основные ветви эволюции. Это дало возможность подтвердить с помощью молекулярно-генетических методов, что штаммы чумы были привнесены на территорию Вьетнама несколько раз из Китая морским и сухопутным путями. Также разработан комплекс праймеров для проведения дифференциации штаммов из Вьетнама в соответствии с их принадлежностью к отдельным генетическим подветвям, основанный на детекции специфических SNPs методом фрагментного секвенирования.

Никифоровым К.А. разработан способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности в виде системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. Кроме того, диссертантом создан способ дифференциации штаммов основных филогенетических ветвей *Y. pestis* методом аллель-специфической ПЦР-РВ.

Итогом диссертационной работы явилась разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* согласно их принадлежности к отдельным подвидам, биоварам и филогенетическим ветвям, применение которой упростит проведение внутривидовой дифференциации штаммов чумы в рамках эпидемиологического расследования вспышек и заносов штаммов возбудителя чумы на территорию России, паспортизации штаммов *Y. pestis* и мониторинге природных очагов чумы.

Результаты работы представлены на российских и международных научно-практических конференциях. По теме диссертации опубликовано 29 работ, из них 14 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК в журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата

наук», 12 публикаций в сборниках и материалах конференций, 3 патента на изобретения РФ.

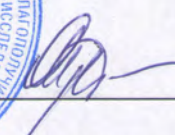
Актуальность и оригинальность выполненной диссертационной работы, ее научная новизна, теоретическая и практическая значимость не вызывают сомнения. Выводы, сделанные при анализе большого числа экспериментальных данных, достоверны. Диссертация соответствует специальности 1.5.11 - микробиология. Диссертантом получены новые значимые данные, обеспечивающие решение практических задач, а также расширяющие сведения по генетическому разнообразию возбудителя чумы и в целом по фундаментальным основам формирования и направлениям эволюции высоко патогенных бактерий.

Диссертационная работа К.А. Никифорова является законченным экспериментальным исследованием, решающим важную научно-практическую задачу по научному обоснованию и созданию системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов возбудителя чумы, которое соответствует требованиям «Положений о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Российской Федерации, и может быть представлена к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Научный консультант,
главный научный сотрудник лаборатории
молекулярной микробиологии
ФКУН РосНИПЧИ «Микроб»
д.б.н., старший научный сотрудник

 / Г.А. Ерошенко /

Подпись Г.А. Ерошенко заверяю
Начальник отдела кадров
ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

 / О.В. Шумигай /

Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).
410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46.

Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12. E-mail: rusrapi@microbe.ru.