



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Роспотребнадзора,
академик РАН, д.м.н., профессор

В.Г.Акимкин

«29» августа 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической значимости диссертационной работы Ярыгиной Марины Борисовны на тему «Молекулярно-генетическая структура *Yersinia pestis* в трансграничном сайлюгемском природном очаге чумы», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Актуальность темы

Несмотря на достижения медицины, чума все еще остается серьезной глобальной проблемой. За последнее десятилетие было зарегистрировано более 5800 случаев заболевания, причем самая крупная вспышка произошла на Мадагаскаре в 2017 году и привела к гибели 229 человек. В 2022 году в трех странах было зарегистрировано в общей сложности 620 случаев заболевания, в том числе 12 с летальным исходом. Однако реальные показатели в районах, где различные виды сурков выступают в качестве переносчиков заболевания, могут быть выше. В России насчитывается 11 активных очагов чумы, наиболее значимым из которых является Горный

Алтай. Обнаружение в 2012 году высоковирулентного штамма чумы и его последующее распространение вызвало эпидемиологическую тревогу. Все это подчеркивает необходимость проведения комплексных исследований эпидемиологической ситуации и молекулярно-генетического мониторинга изменчивости возбудителя в эндемичных по чуме регионах России и Монголии.

Оценка новизны и практической значимости

Научная новизна исследования, полученная диссертантом, заключается в следующем: в работе освещены новые аспекты пространственной структуры *Y. pestis ssp. central asiatica bv. altaica* в Сайлюгемском природном очаге чумы в России с использованием MLVA25-типирования 330 штаммов. Выявлено существование относительно независимых популяций чумного микроба в пределах трех мезоочагов в популяциях монгольской пищухи. Выделены различия во времени в MLVA25-структуре варианта возбудителя в различных мезоочагах. В ходе исследования также впервые обнаружена циркуляция *Y. pestis ssp. pestis* в трансграничном Сайлюгемском очаге чумы, при этом отмечены заметные различия в частоте тандемных повторов в штаммах. Наконец, получены новые сведения о генетической изменчивости 25 VNTR-локусов в *Y. pestis ssp. central asiatica bv. Altaica*, наблюдается значительное разнообразие по шести локусам.

Практическая значимость заключается в следующем: Полученные в ходе исследования результаты способствуют совершенствованию эпидемиологического надзора за чумой в трансграничном Сайлюгемском природном очаге. По результатам исследования были разработаны и внедрены методические документы и базы данных, в том числе руководства по идентификации возбудителя, эпизоотологическому обследованию, практике обеззараживания. В настоящее время эти материалы используются в федеральных центрах Иркутского научно-исследовательского

противочумного института и Алтайской противочумной станции при проведении эпиднадзора за чумой. Кроме того, материалы включены в программы дополнительного профессионального образования сотрудников Роспотребнадзора и других ведомств.

Достоверность результатов исследования

В исследовании использовались различные специальные и общенаучные методы (биологические, микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические, биоинформационные и статистические). Все полученные данные были подвергнуты статистическому анализу с использованием стандартных методов. Достоверность исследования подтверждается обширным собранным материалом, современными методами исследования и статистическим анализом данных. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на различных научно-практических конференциях и конгрессах, в том числе по вопросам эпидемиологического благополучия, охраны окружающей среды, диагностики и профилактики инфекционных заболеваний, биоразнообразия, развития лабораторной диагностики и других, проходивших в 2013-2022 гг. в городах Новосибирск, Саратов, Москва, Санкт-Петербург.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, главы обзора литературы, четырех глав с описаниями оригинальных исследований, заключения, выводов и библиографии. Объем работы составляет 143 машинописные страницы, она содержит 11 таблиц и 17 рисунков. Библиография включает в себя 199 ссылок, в том числе 68 - на английском языке. Диссертация построена по традиционному типу и соответствует требованиям ГОСТ Р7.011-2011.

Во введении диссертации обосновывается актуальность темы, описывается степень разработанности проблемы, формулируются основные цели и задачи. Также излагаются новизна, практическая и теоретическая

значимость исследования, описаны методология и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту. Далее дается описание степени достоверности, верификация результатов, а также информация о месте работы и личном вкладе автора. В конце главы перечисляются научные публикации автора.

В первой главе «Обзор литературы» проанализированы данные о природной очаговости чумы, дана характеристика природных очагов, изложены современные методы идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба.

Во второй главе диссертации перечислены материалы и методы, использованные в работе. Описаны использованные штаммы *Y. pestis* и условия их выращивания, методы изучения культурально-морфологических и биохимических характеристик, а также лекарственной чувствительности и вирулентности анализируемых штаммов *Y. pestis*, идентификации плазмидного профиля штаммов *Y. pestis*, проведения MLVA-типирования, статистическая интерпретация полученных результатов. Для последнего использовали критерий согласия хи-квадрат. Сама работа выполнена на 490 штаммах *Y. pestis*, изолированных на российской и монгольской территориях Сайлюгемского природного очага чумы при проведении эпизоотологического обследования. Штаммы *Y. pestis* исследовали на культурально-морфологические свойства, ферментативную активность в отношении глицерина, рамнозы и арабинозы, чувствительность к чумному и псевдотуберкулезному фагам, способность восстанавливать нитраты до нитритов, потребность в факторах роста, продукцию фракции I и сорбцию гемина, чувствительность к антибактериальным препаратам и плазмидный профиль.

В третьей главе «Фенотипические характеристики и плазмидный профиль штаммов *Y. pestis* из сайлюгемского природного очага чумы» описано исследование фенотипических характеристик бактерии чумы,

осуществленное с помощью широко применяемых методов типирования и диагностики. Основным подходом к классификации штаммов *Y. pestis* являлось определение их принадлежности к древним, средневековым или восточным биоварам главного подвида на основании их способности ферментировать глицерин и восстанавливать нитраты. Кроме того, методы включают анализ пищевых предпочтений штаммов, их способности ферментировать различные сахара (например, рамнозу, арабинозу, мелибиозу и др.), производства пестицина-1, уреазной, фибринолитической и коагулазной активности. Эти подходы применяются для идентификации внутри вида основного и неосновного подвида бактерии чумы из стран СНГ и Монголии. Серотипирование и фаговое типирование также входят в фенотипический анализ возбудителя чумы. Указанные методы остаются актуальными и сегодня, и их используют в лабораторной диагностике штаммов возбудителя чумы.

В четвертой главе “Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Y. pestis ssp. Central asiatica* алтайского биовара при MLVA25-типировании” акцентируется внимание на изучении генотипического разнообразия возбудителя в естественных очагах по методу MLVA25. Исследование проведено на 330 штаммах чумы, изолированных в Сайлюгемском очаге с 1961 по 2015 год. После MLVA анализа 330 штаммов были разделены на 34 генотипа. Анализ показал, что генотипическая структура *Y. pestis* в Тархатинском мезоочаге меняется со временем. Обнаружены две группы штаммов: 1972-1979 и 1990-2014 гг., что указывает на замену доминирующих генотипов после 1980 г. Вероятно, это связано с естественной эпизоотической активностью. В Горно-Алтайском очаге динамика генотипов связана с циклами численности пищух. С 1990 г. активность эпизоотий возросла, увеличилась энзоотическая территория. Смена доминирующих генотипов вызвана “бутылочным горлышком” из-за снижения распространенности чумы.

В пятой главе “Генотипическая структура *Y. pestis ssp. pestis* при MLVA25-типировании” описаны результаты исследования, указывающие на то, что анализируемые штаммы *Y. pestis ssp. pestis* разделены на две группы. Группа А состоит исключительно из штаммов, выделенных в Забайкальском природном очаге России. Эти штаммы, согласно исследованию В.В. Кутырева и коллег, относятся к филогенетической линии 2.ANT3. Между группами А и В обнаружены отличия в двенадцати варибельных локусах. Было проанализировано 160 штаммов *Y. pestis ssp. pestis*, выделенных в 2012-2019 гг. в российской и монгольской частях Сайлюгемского очага. Выявлено 14 MLVA25-типов, большинство штаммов (70) относятся к одному типу S1. Обнаружена низкая изменчивость по 25 VNTR-локусам среди штаммов внутри очага. Выявлены различия в частоте аллелей трех варибельных локусов между штаммами из российской и монгольской частей очага. Показано отсутствие четкой пространственной структуры штаммов *Y. pestis ssp. pestis* внутри Сайлюгемского очага. Сделан вывод о недавнем заносе и быстром распространении данного подвида чумного микроба на всей территории очага.

Раздел «**Заключение**» представляет собой краткое обсуждение выполненных исследований с выделением основных моментов. В данном исследовании был использован метод MLVA25-типирования для анализа генетической варибельности подвидов *Y. pestis*, что обеспечивает более информативные результаты при анализе больших выборок штаммов и помогает оценить генотипическую структуру популяции чумного микроба. Было проанализировано 330 штаммов *Y. pestis ssp. central asiatica bv. altaica*, изолированных в российской части Сайлюгемского природного очага чумы в период с 1961 по 2015 гг. Анализ показал, что 25 VNTR локусов разделены на 34 MLVA типа. Выявлены также три изолированных группы, определённые по месту выделения штаммов. Заметны значительные различия в частоте встречаемости некоторых варибельных локусов между выборками штаммов из разных мезоочагов.

Раздел «**Выводы**» подводит краткий итог работы.

MLVA25-типизация 330 образцов *Y. pestis* из Сайлюгемского очага за период с 1961 по 2019 годы выделена в 34 различных типа. Наблюдается уникальная структура в трех мезоочагах. В Тархатинском мезоочаге микробная структура претерпевает изменения, в то время как в Уландрыкском и Курайском она остается стабильной. Из 25 VNTR-локусов *Y. pestis*, шесть обнаруживают заметное разнообразие, что позволяет выявить различия в образцах из трех мезоочагов.

MLVA25-анализ 160 изолятов *Y. pestis* за период с 2012 по 2022 годы позволил выявить 14 типов. Среди них, 12 типов представлены штаммами из российской или монгольской части очага, в то время как лишь два типа присутствуют в обеих частях. Три переменных VNTR-локуса указывают на гетерогенность микроба и его дифференциацию между образцами. Лocus *ur4280ms62* играет ключевую роль в дифференциации *Y. pestis* в Сайлюгемском очаге.

Личный вклад автора.

Соискателем выполнен сбор информации, организованы эпидемиологические и лабораторные исследования, систематизация первичных данных, их статистическая обработка, формулирование положений, выводов, практических рекомендаций и внедрение результатов исследования.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

На основе выполненных исследований подготовлены и внедрены в работу методические документы: МР 4.2.0090-14 «Использование методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I-II групп патогенности»; МР «Эпизоотологическое обследование Горно-

Алтайского высокогорного природного очага чумы»; МР «Обеззараживание биологического материала, полученного от млекопитающих, добытых на территории сибирских природных очагов чумы»; база данных «Штаммы возбудителя чумы, изолированные в Горно-Алтайском природном очаге», «Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по лабораторной диагностике чумы: для врачей-бактериологов (биологов) и преподавателей». Данные материалы исследований внедрены в практику научно-исследовательской работы ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, включены в лекционные курсы при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Замечания и вопросы для обсуждения

Замечаний и вопросов по представленной диссертационной работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Ярыгиной М.Б. «Молекулярно-генетическая структура *Yersinia pestis* в трансграничном сайлюгемском природном очаге чумы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по исследованию молекулярно-генетической структуре *Yersinia pestis*, что имеет существенное значение для совершенствования эпидемиологического надзора за чумой в природных очагах.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов и выводов диссертационная работа Ярыгиной Марины Борисовны соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на

соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук.

Отзыв на диссертационную работу М.Б. Ярыгиной был заслушан, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора 29.08.2023 г., протокол №7.

Заведующий лабораторией
геномных исследований
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
кандидат биологических наук




Хафизов Камиль Фаридович

Подпись к.б.н. Хафизова К.Ф. заверяю:

Ученый секретарь
ФБУ ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, кан. мед. наук



Никитина Т.С.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Тел. 8-495-672-10-69, e-mail: cri@pcr.ru