

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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 диссертации

Для успешной борьбы с чумой необходимы глубокие знания о строении генома *Yersinia pestis*, а также разработка новых молекулярно-генетических подходов для отслеживания циркуляции штаммов и проведения внутривидового типирования изолятов. Несмотря на успехи в изучении эпидемиологии заболевания и строения генома, многие параметры естественной изменчивости и процесса внутривидовой микроэволюции остаются невыясненными.

Диссертационная работа Ярыгиной М.Б., представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, посвящена изучению филогеографии штаммов чумного микроба с помощью молекулярно-генетического метода, основанного на анализе числа тандемных повторов по 25 локусам (MLVA-25). Исследование выполнено с использованием представительной коллекции штаммов чумного микроба двух подвидов: центральноазиатского подвида алтайского биовара и основного подвида античного биовара, циркулирующих в Сайлюгемском природном очаге на территории России (Горно-Алтайский высокогорный) и Монголии.

Актуальность работы М.Б. Ярыгиной обусловлена не только необходимостью расширения фундаментальных знаний о структуре генома возбудителя чумы, но и потребностью совершенствования молекулярно-генетических подходов во внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*, а также для пространственной и временной характеристики природных очагов чумы, расположенных на территории России и сопредельных государств.

Раздел "актуальность проблемы" дает представление о современном состоянии вопроса и логично подводит читателя к цели и задачам исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертантом вынесено на защиту три положения, которые последовательно обоснованы в рецензируемой рукописи и публикациях по теме диссертации. Все 6 выводов основаны на продуманном плане работ, сочетании классических микробиологических и современных молекулярно-генетических методов исследований, достаточном объеме фактического материала.

Достоверность и новизна положений, выводов и заключения

Достоверность полученных результатов опирается на статистическую обработку и не противоречит современным научным данным. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, вытекают из результатов проведенных исследований и подтверждены фактическим материалом. В разделе «Заключение» диссертант обобщает и анализирует полученные результаты.

Показана пространственная неоднородность возбудителя чумы в трансграничном Сайлюгемском природном очаге. Впервые установлена циркуляция относительно независимых совокупностей штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в популяциях монгольской пищухи в границах трех мезоочагов (Уландрыкском, Тархатинском, Курайском) и выявлены VNTR локусы (*yp2916ms07*, *yp1814ms20*, *yp0581ms40*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*, *yp1925ms71*), обладающие значительным разнообразием аллелей у изучаемой выборки штаммов.

Новыми являются данные о возможности использования частоты встречаемости числа тандемных повторов в трех переменных локусах (*yp2769ms06*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*) в качестве показателя значимости различий между выборками штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis*. Автором доказано, что низкая вариабельность данных локусов в пространственных группах предполагает относительно недавнюю циркуляцию штамма в очаге. Установлен ключевой локус (*yp4280ms62*) для пространственной дифференциации штаммов *Y. pestis* внутри трансграничного Сайлюгемского природного очага.

Практическая и теоретическая значимость

В теоретическом плане ценность представляют выдвинутые автором гипотезы распространения штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* по территории Юго-Восточного Алтая и обоснование относительно недавней циркуляции в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* bv. *antiqua* на основании низкой генотипической изменчивости VNTR локусов в пространственных группах. Полученные результаты важны для оптимизации системы эпидемиологического надзора за чумой в трансграничном Сайлюгемском природном очаге с использованием комплексного эпизоотолого-эпидемиологического и молекулярно-генетического подхода.

На основе полученных результатов создана и зарегистрирована база данных «Штаммы возбудителя чумы, изолированные в Горно-Алтайском природном очаге» (Свидетельство о государственной регистрации № 2018621221); разработаны методические рекомендации МР 4.2.0090-14 «Использование методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I-II групп патогенности» (федеральный уровень внедрения); «Эпизоотологическое обследование Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы» (учрежденческий уровень внедрения); «Обеззараживание биологического материала, полученного от млекопитающих, добытых на территории сибирских природных очагов чумы» (учрежденческий уровень внедрения) и «Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по лабораторной диагностике чумы: для врачей-бактериологов (биологов) и преподавателей» (Иркутск, 2022). К сожалению, научная значимость диссертационной работы подтверждается публикацией полученных результатов только в отечественных научных изданиях.

Разработанные методические приемы применяются при проведении эпидемиологического надзора за чумой в ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, а также материалы диссертации включены в лекционные курсы при подготовке кадров учреждений Роспотребнадзора и других ведомств по программам дополнительного профессионального образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Личный вклад автора заключается в поиске и анализе литературных данных по теме работы, определении цели и задач исследования, планировании проведения экспериментальной работы, обработке полученных результатов. Автор принимал непосредственное участие в эпизоотологическом мониторинге Сайлюгемского природного очага чумы в составе эпидотрядов. Работа выполнена в рамках четырех плановых тем НИР ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 143 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 199 источников, в том числе 131 работу отечественных и 68 - иностранных авторов, и трех приложений. Текст иллюстрирован 11 таблицами и 17 рисунками.

Исследования проводили в рамках четырех плановых НИР отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Во введении четко обозначена актуальность выбранного направления, дана краткая характеристика существующего положения по изучению особенностей генома штаммов чумного микроба, выделяемых в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы (Горно-Алтайский очаг); сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность, положения, выносимые на защиту, данные об апробации работы, публикациях и структуре диссертации, свидетельствующие о соответствии требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по этим позициям.

В обзоре литературы (глава 1) представлен обширный материал, творчески осмысленный и обобщенный автором. Приведены сведения о природной очаговости чумы, охарактеризованы российская (Горно-Алтайский высокогорный природный очаг чумы) и монгольская части Сайлюгемского природного очага и эпидемические проявления чумы на данной территории. Особое внимание уделено методам идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба, рассмотрено генетическое многообразие *Y. pestis*. Обзор написан на основании достаточного объема научных данных, изложенных логично и грамотно. В целом, содержание «Обзора литературы» полностью вводит читающего в курс решаемых диссертантом задач и свидетельствует об актуальности темы исследования.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования. В работе использованы классические микробиологические и молекулярно-генетические подходы. Полученные в ходе исследования данные подвергали статистической обработке. Работа проведена на 490 штаммах *Y. pestis*, изолированных на российской и монгольской территориях Сайлюгемского природного очага чумы при проведении эпизоотологических обследований в 2012-2021 гг., также использованы данные отчетной документации ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт и ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» с 1961 по 2021 гг. В своих экспериментах диссертант опирался на метод MLVA25-типирования, положительно зарекомендовавший себя при изучении генетического многообразия возбудителя чумы. Биоинформационные исследования выполнены с применением современных компьютерных программ.

Описание методологии естественно перетекает в изложение результатов исследования, представленных в главах с третьей по пятую в порядке реализации четырех задач диссертации.

Третья глава посвящена характеристике и изучению плазмидного профиля штаммов *Y. pestis* из Сайлюгемского природного очага чумы. В диссертационной работе Марина Борисовна подтвердила идентичность фенотипических свойств и вирулентности штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica*, выделенных 2012-2022 гг. и штаммов, изолированных в очаге с 1953 по 2011 гг., а также полную идентичность свойств штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* bv. *antiqua*, изолированных в российской и монгольской частях данного очага. При анализе плазмидного профиля показано наличие трех конститивных плазмид чумного микроба у штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* и добавочной криптической плазмиды pTP33 у штаммов *Y. pestis* ssp. *pestis* bv. *antiqua* из Сайлюгемского природного очага чумы.

Четвертая глава посвящена изучению MLVA25 профилей штаммов *Y. pestis* ssp. *central asiatica* bv. *altaica* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы. Исследования проведены на 330 штаммах, выделенных на территории 17 эпизоотических участков из 24 известных. Марине Борисовне удалось дифференцировать изученные штаммы на 34 MLVA25 типа и показать, что изоляты из Уландрыкского и Курайского мезоочагов обладают выраженной стабильностью генетической организации MLVA25

локусов в то время как штаммы из Тархатинского мезоочага с течением времени претерпели существенные изменения этого признака. Для штаммов *bv. altaica* автором установлены шесть VNTR локусов (*yp2916ms07*, *yp1814ms20*, *yp0581ms40*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*, *yp1925ms71*) с наиболее варибельным числом tandemных повторов, анализ которых позволяет дифференцировать изоляты из трех мезоочагов (Уландрыкский, Тархатинский, Курайский) российской части Сайлюгемского природного очага чумы.

В пятой главе диссертационного исследования Марина Борисовна с помощью MLVA25-типирования подтвердила наличие генетических различий между штаммами возбудителя чумы основного подвида, циркулирующими в природных очагах на приграничной территории России и Монголии, а именно Сайлюгемском (Россия, Монголия), Хуух-СерхМунх-Хаирханском (Монголия), Хархиро-Тургенском (Монголия), Забайкальском (Россия), Тувинском (Россия), и показала, что штаммы *Y. pestis ssp. pestis*, изолированные в Сайлюгемском очаге, входят в одну MLVA25 группу. Марине Борисовне удалось дифференцировать 160 изученных штаммов *Y. pestis ssp. pestis*, выделенных в российской и монгольской частях трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы, на 14 MLVA25 типов, показав низкую изменчивость VNTR локусов и отсутствие выраженной географической структурированности при филогенетическом анализе. У штаммов *Y. pestis ssp. pestis* выявлено три варибельных VNTR локуса (*yp2769ms06*, *yp1335ms46*, *yp4280ms62*), частота встречаемости аллелей которых указывает на наличие пространственной дифференциации между выборками штаммов из российской и монгольской частей Сайлюгемского природного очага. Как и в случае штаммов *bv. altaica* ключевым VNTR локусом для определения географической приуроченности штаммов *bv. antiqua* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге оказался локус *yp4280ms62*.

В главе «Заключение» автор подводит итоги работы, обобщает полученные данные.

Шесть выводов, соответствующих поставленным задачам, основаны на представленном экспериментальном материале, являются логическим итогом проделанной работы и не вызывают сомнений в достоверности. Диссертация имеет законченный характер.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации, подтверждения опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Автореферат диссертации позволяет получить полное представление о проведенном исследовании. Основные результаты работы отражены в 27 научных работах, в том числе 11 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации и трех монографиях. Материалы, изложенные в диссертации, представлены и обсуждены на международных, всероссийских и региональных научных конференциях.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом

Представленная на отзыв диссертация Ярыгиной Марины Борисовны «Молекулярно-генетическая структура *Yersinia pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология имеет несомненную практическую ценность, а автор показала себя способным и профессионально состоявшимся исследователем. Текст диссертационной работы написан грамотно. Рисунки высокого качества, информативны.

При анализе диссертационной работы возникли следующие **вопросы**:

1. Почему чума отнесена к социально значимым заболеваниям, хотя согласно Постановлению Правительства Российской Федерации от 01.12.2004 г. № 715 «Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний,

представляющих опасность для окружающих» данную инфекцию относят к заболеваниям, представляющим опасность для окружающих?

2. Можно ли утверждать о наличии основных детерминант вирулентности (то есть об экспрессии кодирующих их генов) у штаммов чумного микроба только на основании изучения плазмидного профиля и роста на среде с гемином?

3. Охарактеризуйте перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования и рекомендации по практическому применению полученных результатов.

Заключение.

Диссертация Марины Борисовны Ярыгиной выполнена на высоком методическом уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – совершенствование методов изучения генетического разнообразия и динамики пространственно-временной структуры штаммов *Y. pestis* на территории природного очага чумы, имеющей значение для дальнейшего развития молекулярной эпидемиологии данной инфекции. В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её решению, теоретическому и научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 № 751), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор - Марина Борисовна Ярыгина заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – «микробиология».

Официальный оппонент:

Док. мед. наук, руководитель
лаборатории микробиологии чумы
Федерального бюджетного учреждения
науки «Государственный научный
центр прикладной микробиологии и
биотехнологии» Роспотребнадзора
8.09.2023 г.

<https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

<http://www.researcherid.com/rid/F-4623-2017>

<http://www.scopus.com/inward/authorDetails.url?authorID=6507448575&partnerID=MN8TOARS>

Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279,
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии». E-mail: dentovskaya@obolensk.org, тел.: 8-916-425-04-74.

/Светлана Владимировна
Дентовская/

Подпись Дентовской С.В. заверяю.

Ученый секретарь Федерального
бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии», док. биол. наук



/Любовь Васильевна Коломбет