

В диссертационный совет
64.1.006.01 по защите диссертаций
на соискание учёной степени кандидата наук,
на соискание учёной степени доктора наук
при Федеральном казённом учреждении науки
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителя и благополучия человека

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук Мокроусова Игоря Владиславовича на диссертационную работу Никифорова Константина Алексеевича «**Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis***», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Актуальность темы диссертационной работы.

Одной из основных задач системы здравоохранения является усовершенствование методологии противодействия чрезвычайным эпидемическим ситуациям, к частному направлению которой относится совершенствование лабораторной диагностики особо опасных инфекций. Возбудитель чумы *Yersinia pestis* представляет собой патоген, способный вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения. При этом штаммы *Y. pestis* отличаются по своим свойствам и обладают разным эпидемическим потенциалом.

Диссертационная работа Константина Алексеевича Никифорова посвящена научно-методическому обоснованию и разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* для усовершенствования микробиологического мониторинга в природных очагах чумы.

Новизна исследования.

В ходе исследований автором были получены новые данные касательно генетического разнообразия штаммов *Y. pestis* из природных очагов Российской Федерации и соседних стран. Итогом этих исследований явилось уточнение внутривидовой классификации *Y. pestis*, согласно которой выделено семь подвидов, различных по эпидемической значимости. В частности было уточнено популяционное разнообразие штаммов центральноазиатского и кавказского подвидов *Y. pestis*. Впервые определена популяционная структура улегейского подвида *Y. pestis*. Автором были обнаружены мутации (несинонимичные SNPs) в генах факторов патогенности, характерные для штаммов центральноазиатского, кавказского и улегейского подвидов. Кроме того, были разработаны способы установления принадлежности штаммов *Y. pestis* к отдельным ветвям эволюции внутри этих подвидов. Впервые был проведён молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis* из Вьетнама, в результате которого предложена научная теория циркуляции разных генетических ветвей возбудителя чумы во Вьетнаме. Сконструирован комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ, с использованием которого появилась возможность проводить внутривидовую дифференциацию основных филогенетических групп *Y. pestis*, а также способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов патогенности на основе системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы.

Результаты диссертационного исследования Никифорова К.А. обогащают представление о структуре вида *Y. pestis*, с помощью определения популяционной структуры кавказского, центральноазиатского, улегейского подвидов. Полученные данные улучшают представление о закономерностях эволюции возбудителя чумы в природных очагах РФ, стран ближнего и дальнего зарубежья. Филогенетический анализ многообразия штаммов из Вьетнама позволил получить новые данные о распространении штаммов *Y. pestis* восточного биовара в течение третьей пандемии.

Автором разработан комплект праймеров и зондов для проведения дифференциации основных ветвей эволюции *Y. pestis* методом аллель-специфической ПЦР-РВ, создан способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, и по наличию основных генов патогенности.

Итогом диссертационной работы Никифорова К.А. явилась разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* согласно их принадлежности к отдельным подвидам и биоварам, основанная методах ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. В рамках выполненной диссертационной работы было зарегистрировано 2 медицинских изделия для *in vitro* диагностики – «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» и «Пест-МЛ ПЦР-биочип».

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа Никифорова К.А. осуществлена на достаточном научно-методическом уровне. В рамках реализации цели работы было сформулировано 6 задач, направленных на осуществление филогенетического анализа кавказского, улегейского, центральноазиатского подвидов *Y. pestis*, и штаммов из Вьетнама, а также разработку способов

внутривидовой дифференциации, основанных на ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке.

Оформление диссертационной работы Никифорова К.А., применённые методы исследования и статистической обработки результатов полностью соответствуют поставленным задачам. Структура диссертации полностью соответствует требованиям, предъявляемым к научным исследованиям уровня докторской диссертации.

Материалы диссертации прошли апробацию на всероссийских и международных научно-практических конференциях. По теме диссертации опубликовано суммарно 29 печатных работ, среди которых: 14 – статей в периодических изданиях, рекомендованных ВАК, 12 - в сборниках и материалах конференций, 3 патента на изобретения РФ. Кроме того, материалы диссертационного исследования включены в 3 коллективные монографии.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Диссертационная работа Никифорова К.А. имеет традиционный принцип, её материалы представлены на 352 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, главы обзора литературы, семи глав собственных исследований (среди которых одна глава с описанием материалов и методов), заключения, выводов и 8 приложений.

Введение посвящено доказательству актуальности и описанию степени разработанности темы исследования, формулированию цели и задач, описанию основных элементов научной новизны, теоретической и практической значимости полученных результатов.

В рамках обзора литературы автором были рассмотрены многие литературные источники касательно генетического разнообразия штаммов *Y. pestis*, исторических и актуальных данных по проблеме чумы в мире, основных современных молекулярно-генетических методов диагностики инфекционных болезней.

В главе 2 перечислены использованное оборудование и реактивы, методики работы со штаммами возбудителя чумы, обеззараживания культуры, изучения биохимических свойств штаммов возбудителя чумы, экстракции нуклеиновых кислот, выполнения ПЦР и ПЦР-РВ, фрагментного и полногеномного секвенирования, гибридизации в системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке, описаны применённые программы биоинформационного и статистического анализа.

В главе 3 описаны результаты исследований по изучению актуальных популяционных структур кавказского, улегейского и центральноазиатского подвидов, поиску генетических причин их избирательной вирулентности. В результате было определено значительное филогеографическое разнообразие штаммов этих подвидов и описаны основные ветви эволюции внутри них. Показано, что вид *Y. pestis* состоит из семи подвидов, штаммы которых обладают различной эпидемической значимостью: основной, тибетский, кавказский, ангольский, центральноазиатский, улегейский, цинхайский. Были обнаружены мутации в генах, кодирующих факторы патогенности, у штаммов кавказского (*astD*, *fyuA*, *hmsF*, *hmsT*, *yopH*, *yopT*, *uscG* и *uscU*), улегейского (*irp1* и *uscQ*) и центральноазиатского (*ybtS*) подвидов *Y. pestis*.

Задачей главы 4 было создание способа детекции ДНК возбудителя чумы с одновременным установлением принадлежности к основному и неосновным подвидам, и дифференциацией отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. В результате было зарегистрировано медицинское изделие для *in vitro* диагностики «ГенПест-подвид/алтай-РГФ», характеризующееся аналитической чувствительностью не менее 1×10^3 м.к./мл при диагностической специфичности 99 % и чувствительности 98,6 %.

Пятая глава посвящена изучению филогенетического многообразия штаммов возбудителя чумы из Вьетнама. Итогом этого направления стало установление наличия 10 ветвей эволюции (1.ORI2v, 1.ORI2vi и 1.ORI2v1—

10) восточного биовара на территории Вьетнама, и реконструкция их распространения.

В шестой главе был разработан способ индикации и идентификации штаммов согласно их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности. Итогом этой главы является регистрация медицинского изделия для *in vitro* диагностики – «Пест-МЛ ПЦР-биочип», обладающего аналитической чувствительностью не менее 1×10^3 м.к./мл при диагностической чувствительности и специфичности не менее 99,0 %.

В главе 7 изложены основные этапы исследований по созданию способа дифференциации штаммов основных филогенетических ветвей *Y. pestis*, для которых ранее не было обнаружено эффективных протяжённых маркерных инсерций или делеций. Проведённые исследования дали возможность создать комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ, позволяющий дифференцировать филогенетические ветви 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED4, 1.IN1, 1.ORI1, 1.ORI2, 1.ORI3.

В восьмой главе описана разработанная комплексная система молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанная на методах ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. Эта система позволяет проводить дифференциацию многих филогенетических ветвей вида *Y. pestis*.

В заключении диссертационной работы проведено суммирование результатов, подведены итоги и озвучены перспективы для будущих исследований, посвящённых микробиологии и филогенетике возбудителя чумы. Выводы диссертационной работы обоснованные, соответствуют поставленным цели и задачам.

Диссертационная работа Никифорова К.А. включает большое количество экспериментальных данных, пояснённых рисунками и

таблицами. Список использованной литературы состоит из 638 источников, среди которых 102 отечественных и 536 зарубежных.

Соответствие специальности.

Диссертационное исследование Никифорова К.А. соответствует следующим пунктам паспорта специальности 1.5.11. – Микробиология: 1. Систематика и филогения микроорганизмов; 2. Эволюция микроорганизмов; 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.

Вопросы и замечания по диссертационной работе.

Принципиальных замечаний к работе нет, однако в процессе изучения диссертации возникло несколько вопросов:

1. В Таблице 2.1 приведена очень подробная информация, которую было бы интересно посмотреть на карте.

2. В Таблице 2.2 желательно указать страну происхождения и год.

3. На с. 122 автор пишет: «целью исследований было изучение популяционной структуры кавказского, центральноазиатского и улегейского подвидов *Y. pestis* и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов, ассоциированных с патогенностью возбудителя чумы». И далее на с. 132-133: «В гене уорТ у штаммов кавказского подвида была найдена замена G→A в позиции 446 от начала гена, которая влечёт замену серина на аспарагин. ... Возможно, найденные мутации служат причинами избирательной вирулентности штаммов кавказского подвида. Однако для подтверждения или опровержения этой гипотезы требуются дальнейшие исследования.»

Вопрос - были ли экспериментальные опыты по вирулентности, не только *in silico*?

Также было бы желательно провести минимальный анализ значимости выявленных замен аминокислот на основе критериев PAM1 (таблицу легко найти в интернете) или SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/index.html>). Кроме того поскольку речь идет о комплексе мутаций (табл 3.4), можно было бы

выполнить анализ сети межгенных взаимодействий программой STRING <https://string-db.org/cgi/input>. Не исключено, что какие-то выводы можно было бы пусть и спекулятивно сделать.

4. На Рисунке 3.3 не показаны значения бутстрапа для оценки надежности ветвей.

5. SNP, отобранные как маркерные для детекции определенных ветвей, были ли проверены и на специфичность и на чувствительность на разнообразных и крупных коллекциях? Для *Y. pestis* возможен горизонтальный перенос генов, не мог ли он повлиять на SNP-маркеры?

6. На с. 139 автор пишет: «На основании полученной дендрограммы можно сделать вывод, что улегейский подвид является наиболее «поздней» ветвью эволюции среди всех неосновных подвидов, которая позже других отделилась от общего ствола эволюции «линии 0» *Y. pestis* (около 3500 лет назад [Valtueña et al., 2022]) (несёт в своём геноме 116 SNPs). Однако, несмотря на то, что штаммы улегейского подвида входят в состав эволюционно древней линии «0» вида *Y. pestis*, они выделялись крайне ограниченный период времени – около 10 лет с 1972 по 1990 гг. Причина, по которой штаммы улегейского подвида не выделялись ранее и не выделяются в настоящее время, остаётся неясной и по сей день.»

Было бы интересно узнать мнение автора по этому вопросу (почему штаммы улегейского подвида не выделялись ранее и не выделяются в настоящее время). Причина может лежать в определенной комбинации мутаций оказавшихся неблагоприятными (high fitness cost) или во взаимодействии с организмом хозяина.

Заключение

Диссертационная работа Никифорова Константина Алексеевича на тему «Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*»

