

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Носова Никиты Юрьевича «Филогенетический анализ и дифференциация штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертационной работы

Бактерии *Yersinia pestis* являются возбудителем периодически проявляющего себя на всех континентах опаснейшего заболевания – чумы. В научной литературе нередко высказываются опасения по поводу возможностей заноса возбудителя чумы из неблагополучных регионов с усилившимися миграционными потоками людей или преднамеренного использования чумного микроба в качестве мощного агента биотеррора.

Как было ранее показано сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб», высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы *Y. pestis* ssp. *pestis* bv. *medievalis* циркулируют в семи из 11 очагов РФ и в большинстве очагов других стран СНГ; зарубежными авторами такие штаммы обнаружены в очагах Ирана и Китая. Однако имеется недостаточно сведений о структуре геномов штаммов средневекового биовара основного подвида *Y. pestis*; существуют методические трудности осуществления дифференциации таких штаммов по их принадлежности к определенным очагам и филогенетическим ветвям линии 2.MED. Между тем постоянное совершенствование способов быстрой идентификации, паспортизации и отслеживания штаммов *Y. pestis* разных биоваров и филогенетических линий необходимы для обеспечения адекватных профилактических, лечебных или даже антитеррористических мероприятий, для молекулярной экспертизы случаев заболевания чумой и для обогащения имеющихся представлений о направлениях эволюции патогенных бактерий. Таким образом, актуальность темы диссертационного исследования Н.Ю. Носова не вызывает сомнений.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, репрезентативность эмпирического материала

Исследования Н.Ю. Носова выполнены на самом современном научно-методическом уровне. В результате предварительного анализа основных

литературных данных, близких к теме диссертации, был хорошо обоснован выбор направления исследований диссертанта. Цель его работы заключалась в филогенетическом анализе и разработке способов дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы РФ, других стран СНГ и ближнего зарубежья. Для решения пяти поставленных в работе взаимосвязанных задач были использованы адекватные методы микробиологии, биохимии, молекулярной генетики и биоинформатики и современная приборная база.

Диссертационная работа Н.Ю. Носова выполнена на очень представительной коллекции из 142 штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в период с 1912 по 2016 г. из нескольких десятков природных очагов России, сопредельных государств и дальнего зарубежья. Проанализированы геномные ДНК 167 штаммов *Y. pestis*, включая 98 штаммов из очагов РФ и стран СНГ, геномы которых секвенированы в РосНИПЧИ «Микроб». Для полногеномного секвенирования, выполненного в рамках диссертационной работы Н.Ю. Носова, были выбраны выделенные из очагов РФ и стран СНГ 46 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара с типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами, которые также исследовались диссертантом. Три основных положения, выносимых на защиту, и пять основных выводов, приведенных в диссертации, обоснованы, достоверны и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

Научная новизна работы

По результатам анализа геномов 46 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы РФ, стран СНГ и других стран ближнего зарубежья и геномов штаммов чумного микроба из международной базы данных GenBank (NCBI, США) определена современная популяционная структура средневекового биовара чумного микроба. Установлено, что штаммы средневекового биовара, циркулирующие в очагах чумы на территории РФ, стран СНГ и Монголии, принадлежат к филогенетической линии 2.MED1, за исключением штаммов линии 2.MED0 из Центрально-Кавказского высокогорного очага РФ. В составе филогенетической линии 2.MED1 выявлено наличие двух основных ветвей: Кавказско-Каспийской и Среднеазиатско-Китайской, соответствующих регионам распространения штаммов средневекового биовара.

В геномах штаммов средневекового биовара филогенетической линии 2.MED1 выявлена делеция размером 33 т.п.н., расположенная на хромосоме между генами YPN_2804 и YPN_2837 (относительно генома *Y. pestis* Nepal516). Найдена делеция длиной 73 п.н. в гене *clpV/y1538* (относительно генома *Y. pestis* KIM10), специфичная для линии 2.MED3 штаммов средневекового биовара. Обе делеции отсутствуют у штаммов линий 2.MED0 и 2.MED2. На основе этих двух вариабельных участков генома, а также полногеномных SNPs профилей штаммов разработаны способы дифференциации штаммов средневекового биовара с помощью ПЦР и SNPs типирования. Показано, что с помощью ПЦР с праймерами к выбранным мишеням в генах YPN_2820 и *clpV/y1538* возможно осуществление дифференциации штаммов филогенетических ветвей 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3; а вместе с ранее предложенными мишенями Med24 и 2.MED0 – штаммы всех ветвей средневекового биовара и в целом линии 2.MED от других штаммов чумного микроба. С помощью этого способа подтверждена принадлежность 74 исследованных штаммов средневекового биовара из очагов стран СНГ к ветви 2.MED1.

Разработан способ определения принадлежности штаммов *Y. pestis* средневекового биовара к пяти очагам РФ (Волго-Уральскому песчаному, Волго-Уральского степному, Прикаспийскому песчаному, Терско-Сунженскому низкогорному и Центрально-Кавказскому высокогорному) с помощью SNP типирования. Выявлены SNPs, маркерные для штаммов из названных очагов; рассчитаны праймеры и условия проведения ПЦР, позволяющие амплифицировать, а затем и секвенировать участки генома с вариабельными нуклеотидами (относительно генома *Y. pestis* CO92) и локализовать в них маркерный нуклеотид.

Получены MLVA25 генотипы штаммов *Y. pestis* из 10 очагов РФ и 22 очагов других стран СНГ и ближнего зарубежья. В программе Bionumerics 7.6 создана база данных MLVA25 генотипов штаммов из 32 очагов стран СНГ, позволяющая устанавливать очаговую принадлежность изолятов *Y. pestis*.

Сформулировано предложение о выделении нового подвида чумного микроба: *Y. pestis* ssp. *tibetica*, представленного самыми древними (из сохранившихся) штаммами *Y. pestis* с территории Тибета в Китае, легшими в основание построенного филогенетического дерева *Y. pestis*.

Научно-практическая значимость полученных результатов

Предложен эффективный алгоритм биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *Y. pestis*, предполагающий использование общедоступных программ Wombac 2.0, MEGA 7.0, PAUP 4.0, PhyML 3.1 и FigTree 1.4.3. Разработанные способы дифференциации штаммов средневекового биовара с помощью методов ПЦР, SNPs типирования, MLVA25 и полногеномного секвенирования и собранные с их помощью данные об индивидуальных генотипах исследованных штаммов *Y. pestis* должны способствовать повышению эффективности эпидемиологического мониторинга в очагах РФ и стран СНГ.

Полученные знания о современной популяционной структуре штаммов возбудителя чумы средневекового биовара делают возможными исследования направлений их эволюции и адаптации к существованию в условиях различных биоценозов и ландшафтов, совершенствования внутривидовой систематики чумного микроба.

Результаты диссертационного исследования Н.Ю. Носова вошли в методические рекомендации «Определение подвидовой, биоварной и очаговой принадлежности штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов России и сопредельных стран СНГ методом MLVA25 анализа» и «Алгоритм построения филогенетических деревьев штаммов *Yersinia pestis* по данным полногеномного SNP анализа», утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб»; в преподаваемые в РосНИПЧИ «Микроб» курсы лекций и в монографию «Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья с 1876 по 2016 гг.» / Ред. В.В. Кутырев, А.Ю. Попова. Саратов, 2016. 223 с.

Кроме того, в международные базы данных депонированы нуклеотидные последовательности геномов (в виде нескольких сотен протяженных контигов) 12 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из очагов стран СНГ.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Работа выполнена автором в отделе микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках двух плановых тем НИР. Автор анализировал современную литературу по теме диссертации, намечал планы работ, участвовал в получении и обработке экспериментальных данных. Автором лично разработаны подходы к проведению сравнения полногеномных последовательностей штаммов

возбудителя чумы средневекового биовара для выявления оптимальных ДНК мишеней, праймеров и условий ПЦР с электрофоретическим учетом результатов; выявлены однонуклеотидные полиморфизмы, специфичные для штаммов *Y. pestis* из пяти природных очагов чумы на территории РФ. Автором лично получены MLVA25 генотипы штаммов *Y. pestis* из очагов чумы РФ и сопредельных государств и создана база данных MLVA25 генотипов в программе Bionumerics 7.6. При помощи разработанного алгоритма построения филогенетических деревьев автором определена современная популяционная структура средневекового биовара *Y. pestis*. Секвенирование фрагментов ДНК и бактериальных геномов (с депонированием в базе данных GenBank полногеномных нуклеотидных последовательностей 12 штаммов *Y. pestis*), опубликование статей и тезисов докладов выполнено в соавторстве с другими сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» (см. автореферат диссертации).

Апробация работы, публикации

Результаты диссертационного исследования Н.Ю. Носова прошли достаточную апробацию. По теме диссертации опубликованы четыре статьи в изданиях «Проблемы особо опасных инфекций» и «Генетика» из Перечня российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (<http://vak.ed.gov.ru/ru/87>), и тезисы семи докладов. Материалы диссертации были представлены автором на всероссийских, всероссийских с международным участием и международных научно-практических конференциях, симпозиуме и семинаре (Москва, 2014; Казань, 2014; Саратов, 2015, 2016; Тбилиси, 2016), а также на итоговых научных конференциях РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2014, 2015, 2016).

Оценка содержания диссертации

Общий объем диссертации составляет 130 страниц; основными разделами являются: введение (12 с.), обзор литературы (17 с.), глава с описанием материалов и методов исследования (17 с.), три главы с изложением и обсуждением собственных экспериментальных данных (51 с.), заключение (10 с.), пять выводов (1 с.) и список литературы (18 с.). Представленный материал проиллюстрирован 15 рисунками и 14 таблицами. В список литературы включены 158 источников, в том числе 55 публикаций на русском и 103 – на английском языке.

Во Введении хорошо обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы ее цель и задачи, а также приведены другие традиционные для этого раздела диссертаций сведения.

Глава 1 посвящена обзору основной литературы, посвященной систематике, характеристике современной популяционной структуры и филогенетического разнообразия и вопросам молекулярного типирования штаммов *Y. pestis*. Проведенный анализ позволил автору определить перспективные направления собственных работ.

В главе 2 приведена необходимая информация о многочисленных штаммах чумного микроба, послуживших объектом исследований автора, и об использованных микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических и биоинформационных методах.

Глава 3 диссертации содержит сведения о результатах филогенетического анализа штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов РФ, других стран СНГ и ближнего зарубежья, выполненного с использованием полногеномных нуклеотидных последовательностей ДНК.

До проведения секвенирования геномов автору пришлось провести микробиологический анализ очень обширной коллекции штаммов *Y. pestis* и выбрать штаммы средневекового биовара с типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами.

Диссертантом осуществлен сравнительный анализ геномов 165 штаммов чумного микроба разных подвидов, в том числе 98 геномов штаммов из очагов РФ и других стран СНГ, секвенированных в РосНИПЧИ «Микроб». В результате использования подобранных автором биоинформационных программ и алгоритмов, в коровом геноме *Y. pestis* выявлены 2046 SNPs. Эти данные позволили построить дендрограмму, отражающую глобальную филогению вида *Y. pestis*, а после ее анализа предложить выделение нового подвида – *Y. pestis* ssp. *tibetica*, включающего наиболее древние из сохранившихся тибетско-китайские штаммы.

Для анализа популяционной структуры средневекового биовара чумного микроба были использованы полногеномные нуклеотидные последовательности 71 штамма, в том числе 46 штаммов из стран СНГ. Показано, что линия 2.MED четко делится на филогенетические ветви 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3. Установлено

подразделение штаммов ветви 2.MED1 на Кавказско-Каспийскую и Среднеазиатско-Китайскую группы, в состав которых входят несколько кластеров штаммов. Обнаружены штаммы *Y. pestis* 139 (выделенный в 1966 г. от большой песчанки в Таукумском пустынном очаге), 595 (выделенный в 2014 г. из Прикаспийского песчаного очага) и 556 (выделенный в 1945 г. в Волго-Уральском песчаном очаге от больного человека), содержащие существенно более высокое, чем у других штаммов, количество дифференцирующих SNPs. Таким образом, штаммы из одного и того же очага могут эволюционировать независимо друг от друга и с разной скоростью.

Технические замечания по главе 3:

(1) Название этой главы не вполне отражает представленные здесь же результаты анализа глобальной филогении вида *Y. pestis* (а не только филогении штаммов средневекового биовара чумного микроба).

(2) В названии Таблицы 3 (с. 51) содержатся явные опечатки (два слова без окончаний, утраченный предлог).

Глава 4 диссертации посвящена анализу особенностей организации геномов штаммов *Y. pestis* средневекового биовара и разработке способов дифференциации штаммов этого биовара, относящихся к филогенетическим ветвям 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3. Для этого было осуществлено сравнение геномов 71 штаммов названных ветвей, нуклеотидные последовательности которых были определены в РосНИПЧИ «Микроб» или взяты из базы данных GenBank. В результате в геномах 51 штамма ветви 2.MED1 была выявлена делеция длиной 33 т.п.н. между хромосомными генами YPN_2804 и YPN_2837 (относительно генома *Y. pestis* Nepal516); а в геномах штаммов ветви 2.MED3 обнаружена делеция 73 п.н. в положении 1703381–1703454 (в гене *clpV*/y1538 – относительно генома штамма *Y. pestis* KIM10). Подобраны праймеры к соответствующим мишеням 2.MED1 и 2.MED3 и условия проведения ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, успешно примененных для отнесения штаммов средневекового биовара к филогенетической ветви 2.MED1, 2.MED2 или 2.MED3. Разработанный способ апробирован на 78 штаммах средневекового биовара из семи природных очагов РФ и 21 очага Средней Азии, а также на нескольких штаммах из Китая, Индии и Монголии. В результате установлено, что штаммы из очагов РФ и Средней Азии относятся к филогенетической ветви 2.MED1; впервые показано присутствие штаммов

средневекового биовара (ветви 2.MED1), по меньшей мере, в одном из монгольских природных очагов чумы. Три китайских штамма средневекового биовара отнесены к ветви 2.MED2; а штаммы ветви 2.MED3 не обнаружены.

Установлено, что при включении в ПЦР-анализы еще двух специфических ДНК мишеней, определенных сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» ранее, удастся дифференцировать штаммы средневекового биовара от штаммов других биоваров основного подвида и других подвидов, а также устанавливать принадлежность штаммов средневекового биовара чумного микроба (филогенетическая линия 2.MED) к филогенетической ветви 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 или 2.MED3.

Следующим этапом диссертационной работы стала разработка способа SNPs типирования штаммов филогенетической ветви 2.MED1, применимого для отнесения штаммов средневекового биовара к тому или иному природному очагу чумы РФ и стран СНГ. Автору удалось найти SNPs, маркерные для пяти природных очагов чумы РФ. Для пяти ДНК-мишеней подобраны праймеры и условия ПЦР, позволяющие амплифицировать, а затем секвенировать участки генома с переменными нуклеотидами и локализовать в них маркерный нуклеотид (относительно генома *Y. pestis* CO92), характерный для штаммов из Центрально-Кавказского высокогорного, Терско-Сунженского низкогорного, Волго-Уральского песчаного, Волго-Уральского степного или Прикаспийского песчаного очага. Проверка эффективности предложенного способа SNP типирования на 62 штаммах, в том числе на 30 штаммах из пяти перечисленных очагов РФ, показала 100% специфичность выбранных SNPs.

Преимуществом предложенных способов дифференциации штаммов средневекового биовара является возможность быстрого и сравнительно недорогого изучения анализа популяционной структуры штаммов средневекового биовара, в том числе, при эпидемиологическом мониторинге природных очагов чумы в РФ и странах СНГ.

Технический вопрос по тексту главы 4:

Если обнаруженная в геномах штаммов ветви 2.MED3 делеция затрагивает нуклеотиды в позиции 1703381–1703454 (относительно генома штамма *Y. pestis* KIM10) (см. подпись к рис. 8 на с. 73 диссертации), ее длина, вероятно, составляет не 73, а 74 п.н.?

В Главе 5 изложены результаты работы Н.Ю. Носова по дифференциации штаммов *Y. pestis* из природных очагов РФ и стран ближнего зарубежья методом MLVA. Автор отмечает, что метод мультилокусного анализа переменного числа tandemных повторов (MLVA) нуклеотидов (MLVA7, MLVA25, MLVA43 и др.) в течение 20 лет широко используется для выявления генотипов разнообразных бактерий, включая *Y. pestis*. Однако для характеристики штаммов чумного микроба из очагов РФ и стран ближнего зарубежья (вероятно, за исключением Китая) этот метод применялся не столь широко. В связи с этим диссертантом определены MLVA25 генотипы 54 штаммов чумного микроба нескольких подвидов/биоваров, выделенных из природных очагов РФ, Средней Азии и Кавказа и проведено их сравнение с MLVA генотипами 20 штаммов *Y. pestis* из очагов Ирана, Китая, Монголии, Непала, США и ряда других стран. Эта информация была получена в результате постановки ПЦР с праймерами к 25 известным VNTR локусам на ДНК из нескольких десятков штаммов *Y. pestis* и последующего секвенирования полученных ампликонов или с помощью биоинформационного анализа публичных баз данных о полногеномных нуклеотидных последовательностях этих бактерий. Построение дендрограмм показало, что кластеризация бактерий на основании их MLVA25 генотипов в целом соответствует адресам и времени выделения штаммов, но не вполне согласуется с установившимися представлениями о филогении *Y. pestis*. С помощью MLVA25 автору удалось выявить различия между штаммами чумного микроба, выделенными из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в 2012–2014 гг. и в 2016 г., хотя SNPs профили этих штаммов были идентичны. В результате MLVA7 десяти эпидемически опасных штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1926–1970 гг. из Забайкальского степного очага показана их кластеризация в две группы по времени выделения: в 1923–1927 гг. и в 1966–1970 гг.

Диссертантом создана удобная для использования база данных о MLVA25 генотипах исследованных бактерий и установлено, что MLVA25 генотипы штаммов чумного микроба из природных очагов РФ и стран ближнего зарубежья являются уникальными. Эти сведения обогащают имеющиеся представления о разнообразии штаммов *Y. pestis* и облегчают работу по характеристике вновь выделяемых штаммов этой бактерии при наблюдении за природными очагами чумы или в ходе вспышек.

Техническое замечание и вопрос по главе 5:

(1) Согласно тексту на с. 87 и 98 диссертации (и на с. 5 и 17 автореферата), автором были определены MLVA25 генотипы 54 штаммов..., но в выводе 5 говорится о том, что «Получены MLVA25 генотипы 52 штаммов *Y. pestis* из 32 очагов России и стран СНГ...». (Заметим здесь, что созданная Н.Ю. Носовым база данных о MLVA25 генотипах нескольких десятков штаммов чумного микроба, вероятно, является обновляемым ресурсом, и потому возможная опечатка в выводе 5 не критична).

(2) В диссертации указано, что созданная база данных о MLVA25 генотипах 54 штаммов чумного микроба относится к «учрежденческому уровню» (с. 12 диссертации). В связи с этим возникает вопрос о том, могут ли и каким образом эти важные сведения использоваться специалистами из других противочумных организаций?

В Заключении к диссертации подчеркивается, что благодаря применению разработанных в РосНИПЧИ «Микроб» систем молекулярного типирования штаммов чумного микроба, в частности, ранее была выявлена циркуляция обладающих высоким эпидемическим потенциалом штаммов средневекового биовара основного подвида *Y. pestis* в семи из 11 природных очагов чумы в РФ и в большинстве очагов стран СНГ. В этом разделе суммированы уже обсуждавшиеся выше основные результаты масштабных микробиологических, молекулярно-генетических и биоинформационных анализов генотипов и филогении очень представительной коллекции штаммов *Y. pestis* средневекового биовара основного подвида и штаммов других биоваров и подвидов, выполненных в рамках диссертационной работы Н.Ю. Носова.

Автореферат диссертации полностью отражает её содержание и оформлен в соответствии с общепринятыми правилами.

Заключение

Диссертация Носова Никиты Юрьевича «Филогенетический анализ и дифференциация штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи разработки способов молекулярного

типирования и исследования филогении штаммов возбудителя чумы, циркулирующих в природных очагах РФ, СНГ и ряда других стран.

По актуальности, научной новизне, научно-практической значимости и достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и рекомендаций, работа «Филогенетический анализ и дифференциация штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара» полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор этой работы, Носов Никита Юрьевич, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Кацы Елена Ильинична

Доктор биологических наук, профессор

Заведующая лабораторией генетики микроорганизмов

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов

Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

«02» мая 2017 г.

410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН

тел.: 8-8452-970444; e-mail: ei_katsy@mail.ru

Подпись Е.И. Кацы удостоверяю.

Заместитель директора ИБФРМ РАН по научной работе

д.б.н. профессор

Матора Л.Ю.

«2» мая 2017 г.

