

РЕЦЕНЗИЯ

на автореферат диссертации Носова Никиты Юрьевича
«ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ
ШТАММОВ *Yersinia pestis* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА»,
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 03.02.03 – микробиология

В ряде очагов, расположенных на территории России, а также в государствах, примыкающих к нашим границам, распространены штаммы, относящиеся к биовару *mediaevalis* основного подвида возбудителя чумы. Это высоковирулентные и эпидемически опасные штаммы, которые, по мнению ряда исследователей, являлись инфекционным агентом, вызвавшим вторую пандемию чумы, унесшую миллионы жизней в Европе, Азии, Африке. Штаммы этого биовара до настоящего времени выделяются в природных очагах чумы и это предполагает осуществление постоянного контроля над их персистенцией и свойствами. Таким образом, изучение этих штаммов остается актуальной и важной задачей. Вместе с тем для совершенствования лабораторной диагностики чумы необходимо внедрять в практику современные методы, позволяющие оперативно давать ответы на вопросы, возникающие при лабораторном и эпидемиологическом анализе. Представленная работа один из фрагментов исследования различных биоваров возбудителя чумы, которые вносят вклад в общую картину, складывающуюся из сведений, полученных при изучении всех биовариантов. Авторы поставили перед собою цель провести изучение штаммов конкретного биовара *mediaevalis* для сравнительного анализа их геномов и определения возможности внутрибиоварной дифференциации штаммов, выделенных из различных природных очагов. Для осуществления намеченной цели были поставлены задачи, к решению которых привлечены современные методы исследования и имеющееся в распоряжении авторов оборудование, позволяющее выполнить все запланированные исследования на высоком научном и технологическом уровнях.

Задача по отбору исследуемых штаммов и осуществлению их полногеномного секвенса была успешно решена и получены данные о нуклеотидных последовательностях 46 штаммов средневекового биовара, которые являются референтными для 7 очагов России и 16 очагов стран СНГ.

Выяснение нуклеотидных последовательностей штаммов, использованных в работе – это необходимый, но недостаточный этап для применения полученных знаний. Важным является также проведение эффективного анализа полученных данных. Существование многочисленных программных продуктов не гарантирует адекватного сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей определенных при секвенировании. Автор в ходе собственных исследований пришел к выводу, что наиболее адекватным и эффективным в анализе нуклеотидных последовательностей у различных штаммов *Yersinia pestis* является алгоритм, при котором необходимо пройти 4 этапа анализа и использовать такие программы как Wombac 2.0, MEGA 7.0, RAUP 4.0, PhyML 3.1, а при построении филогенетического дерева - FigTree 1.4.3. При этом учитывалось и наличие областей гомоплазий в геноме *Y. pestis*. Одна из использованных программ выявляла SNP в этих областях и удаляла их из анализа. (Гомоплазия — это сходство признаков, которое возникло не из-за того, что они унаследованы от одного общего предка, а благодаря спонтанным мутациям у исследуемых организмов). В результате проведенного анализа удалось выявить значимые SNP и построить дендрограмму, отражающую филогенетическое родство различных штаммов *Yersinia pestis* биовара *mediaevalis*. Необходимо отметить, что предложенный алгоритм может значительно облегчить работу других исследователей, которые занимаются анализом данных секвенирования, тем более, что разработанный алгоритм является простым, основан на использовании находящихся в открытом доступе и бесплатных программ, удобных в использовании. С помощью проведенного анализа были выявлены 2046

полиморфных SNPs. Это позволило распределить исследуемые геномы по различным генотипам. Хочется особо отметить данные автора, которые еще раз подтверждают, а в ряде случаев уточняют возраст штаммов, которые относятся к определенным генетическим линиями. Так автор свидетельствует, что наиболее древними штаммами являются штаммы неосновных подвидов, это штаммы линии O.PE7 из Тибета в Китае, штаммы кавказского подвида линии O.PE2 из очагов Кавказа и штамм Ангола из Африки линии O.PE3. В одну филогенетическую линию O.PE4 объединились штаммы алтайского и гиссарского подвидов, таласские штаммы из Кыргызстана и штаммы *microtus* из Китая. Наиболее молодую ветвь неосновных подвидов составили штаммы улегейского подвида из Монголии, которую авторы предлагают обозначить в новую линию - O.PE9. Представленные данные позволили авторам предложить усовершенствованную внутривидовую классификацию штаммов возбудителя чумы. Этой классификации авторы предлагают среди штаммов основного подвида различать 3 известных биовара, а возможно еще и дополнительно биовар *intermedia*, о котором говорят уже давно многие исследователи. Штаммы неосновных подвидов автор предлагает перераспределить между подвидами несколько иначе, как это было принято до настоящего времени, исходя из их филогенетического родства. По мнению авторов необходимо объединить в центральноазиатский подвид (*ssp. central asiatica*) биовары алтайский, *microtus*, гиссарский, таласский. Предложено также выделить новый биовар *ssp. tibetica* (тибетский). В него должны быть включены самые древние штаммы, выделенные в Китае. Подобный анализ проведен и в отношении генотипов штаммов средневекового биовара. Выявлена более древняя линия штаммов, распространенных в Центрально-Кавказском очаге, построено филогенетическое дерево для штаммов биовара *mediaevalis*. Отдельно хочется отметить полученные автором данные о различных генетических ветвях филогенетического дерева, включающих штаммы средневекового биовара из природных очагов России и СНГ, генотипически

отличающиеся друг от друга и составляющие отдельные генетические группы. Эти данные позволяют проводить более точную и углубленную кластеризацию штаммов по времени и месту их выделения.

Решение перечисленных задач позволило перейти к следующему этапу исследования, заключающемуся в поиске генетических различий внутри средневекового биовара и использовании полученных сведений для практического применения. С этой целью при идентификации отдельных штаммов и их дифференциации внутри биовара проведен поиск *indel*-маркеров в ДНК штаммов каждой из трех линий средневекового биовара и в ДНК штаммов двух из них 2.MED1 и 2.MED3 такие маркеры были обнаружены. В дальнейшем эти различия были использованы для конструирования праймеров, позволивших провести дифференциацию штаммов всех трех генетических линий (2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3). Авторы предприняли также попытку найти различия в ДНК у штаммов средневекового биовара, выделенных из различных природных очагов. С помощью SNP маркеров удалось выявить точечные различия между штаммами только в 5 очагах. Эти данные послужат хорошей базой для проведения дифференциации штаммов в этих очагах.

Еще один метод, который применил автор при проведении исследований для генотипирования штаммов средневекового биовара, являлся метод мультилокусного VNTR типирования с использованием 25 локусов. Исследования разнообразия вариабельных повторов в различных штаммах средневекового биовара дополнили картину генотипического разнообразия и позволили сделать важный вывод о том, что метод MLVA25 не позволяет точно воспроизводить порядок эволюционной дивергенции отдельных ветвей филогенетического дерева *Y.pestis*, но он правильно разделяет штаммы средневекового биовара по очагам и времени их происхождения, и это часто происходит более эффективно, чем при использовании SNP типирования.

Автор показал возможность использования данных, полученных при применении разнообразных методов как при анализе генотипических групп

