

## ОТЗЫВ

### официального оппонента

доктора медицинских наук Мироновой Лилии Валерьевны  
на диссертацию **Никифорова Константина Алексеевича**  
**«НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОЙ**  
**СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ**  
**ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*»,** представленной на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук по специальности **1.5.11 – микробиология**

#### **Актуальность темы диссертационного исследования.**

В современном мире чума остается одной из серьезных угроз биологической безопасности населения, способной вызвать чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, требующую проведения мероприятий по санитарной охране территории. В условиях интенсивной глобализации, изменения климата, антропогенной трансформации природных биотопов наблюдается изменение эпизоотической активности и эпидемического потенциала природных очагов инфекционных болезней в целом и природных очагов чумы, в частности. Известно, что для чумного микроба характерна внутривидовая вариабельность биологических свойств, в том числе эпидемической значимости. В природных очагах чумы России и сопредельных государств циркулируют варианты *Yersinia pestis*, относящиеся к различным подвидам и биоварам, а для отдельных очагов, характерна сочетанная циркуляция возбудителя двух подвидов (в частности, Горно-Алтайский высокогорный природный очаг чумы и др.).

Такая ситуация определяет необходимость изучения филогенетической структуры популяций возбудителя чумы в природных очагах для выяснения закономерностей его эволюции, путей распространения отдельных клонов патогена, а также создания эффективных способов оперативного выявления, дифференциации и комплексной характеристики разных вариантов *Y. pestis*, обеспечивающих своевременную разработку комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий.

С учетом этого, диссертационная работа Никифорова К.А., цель которой заключается в научно-методическом обосновании и разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* на основе данных филогенетического анализа штаммов возбудителя чумы для повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы, несомненно актуальна.

Для достижения поставленной цели диссертантом определено шесть задач, которые последовательно решались в ходе выполнения диссертационного исследования.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Научные положения и выводы диссертации согласуются с поставленными задачами, основаны на результатах повторных экспериментов с использованием репрезентативной выборки штаммов чумного микроба из разных очагов, а также нуклеотидных последовательностей геномов *Y. pestis*, представленных в международных базах данных. Исследование выполнено с применением комплекса классических и современных методов (микробиологический, молекулярно-генетический, включая варианты ПЦР, фрагментное и полногеномное секвенирование, гибридизационные), результаты проанализированы с использованием стандартной статистической обработки данных и биоинформатических алгоритмов.

Результаты исследований широко представлены на различных Всероссийских и Международных научно-практических конференциях, конгрессах и симпозиумах.

**Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций** диссертационной работы определяются разносторонним изучением проблемы, применением системного подхода к анализу результатов, что позволило автору научно обосновать разработанную комплексную систему молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*.

В диссертационной работе проведен детальный филогенетический анализ популяций чумного микроба в природных очагах Российской Федерации и ряда сопредельных государств. Полученные данные по геномным особенностям в комплексе с оценкой фенотипических признаков легли в основу уточнения классификации *Y. pestis* с выделением нового подвида – цинхайского филогенетической линии O.PE10, который ранее входил в состав центральноазиатского подвида.

На основании анализа геномов и реконструкции филогении определена популяционная структура центральноазиатского подвида *Y. pestis* с входящими в его состав представителями чумного микроба четырех биоваров, циркулирующими в очагах центральноазиатской зоны природной очаговости чумы; установлено распространение нескольких филогенетических ветвей *Y. pestis* кавказского подвида, согласующихся с территорией циркуляции; получены новые данные по популяционной структуре и закономерностям распространения эволюционных ветвей *Y. pestis* улегейского подвида; впервые проведен молекулярно-генетический анализ популяционной структуры восточного биовара основного подвида *Y. pestis* из природных очагов чумы Вьетнама.

Автору впервые удалось идентифицировать группоспецифические мутации в геномах отдельных неосновных подвидов чумного микроба – мутацию в гене *ybtS*

штаммов центральноазиатского подвида; несинонимичные мутации в генах *astD*, *fyuA*, *hmsF*, *hmsT*, *yopH*, *yopT*, *yscG*, *yscU* штаммов кавказского подвида; однонуклеотидную замену в гене фактора патогенности *yscQ* у штаммов улегейского подвида. Указанные мутации, по предположению автора, могут быть связаны с избирательной вирулентностью штаммов данных подвидов чумного микроба.

В процессе анализа геномов в каждой группе штаммов *Y. pestis* выявлены специфические маркерные однонуклеотидные полиморфизмы или мутации другого типа (в частности, in/del), что легло в основу разработки способов идентификации и дифференциации чумного микроба разных подвидов, биоваров и отдельных филогенетических ветвей по спектру аллель-специфических ПЦР или методом фрагментного секвенирования.

Предложен подход для внутривидовой идентификации и дифференциации основных филогенетических групп *Y. pestis* по комплексу детерминант, определяющих принадлежность к подвиду, биовару, филогенетической линии, а также наличию генов патогенности (всего 18 ДНК-мишеней) в формате мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной регистрацией результатов на твёрдой подложке (биологическом микрочипе).

Существенную научную новизну представляет разработанная комплексная система молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*. Диссертант научно обосновал эффективность применения методов ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР, мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным детекцией результатов в формате биочипа в рамках микробиологического мониторинга чумы.

### **Практическая и теоретическая значимость полученных автором результатов.**

В теоретическом аспекте несомненную ценность представляют полученные в рамках диссертационного исследования данные о филогенетическом разнообразии чумного микроба отдельных подвидов и закономерностях распространения ветвей эволюции патогена во времени и пространстве.

На современном методическом уровне с установлением филогенетической структуры *Y. pestis* подтверждено существование сопряженных природных очагов чумы, в которых наблюдается циркуляция микроба разных подвидов, в частности высокопатогенного чумного микроба основного подвида и обладающих избирательной вирулентностью вариантов возбудителя неосновных подвидов.

В результате изучения популяционной структуры рано дивергировавших групп *Y. pestis* уточнены их ареалы в природных очагах чумы, а также получены новые данные о структурно-функциональной организации геномов и возможной

генетической детерминированности избирательной вирулентности. Выдвинута гипотеза о том, что наиболее ранней эволюционной ветвью алтайского биовара центральноазиатского подвида являются штаммы из Уландрыкского мезоочага Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы.

Фундаментальное значение имеет предложенное автором усовершенствование классификации возбудителя чумы с дифференциацией на семь подвигов, различающихся по эпидемической значимости.

Впервые представлена научно обоснованная теория циркуляции штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей во Вьетнаме и проведено районирование территории страны по распространению SNP-генотипов.

Существенную практическую значимость представляют разработанные на основе выявленных специфических полиморфизмов генома отдельных групп возбудителя чумы способы молекулярно-генетической идентификации штаммов из природных очагов чумы с определением их принадлежности к подвидам, биоварам, основным филогенетическим ветвям, а также оценки вирулентности *Y. pestis*.

Ряд этих разработок послужил основой для создания и регистрации в установленном порядке наборов реагентов: «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» для детекции ДНК штаммов *Y. pestis* в пробах биологического, клинического материала, объектов окружающей среды с одновременным определением принадлежности к основному и неосновным подвидам и с отдельной дифференциацией алтайского биовара центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ (Регистрационное удостоверение No P3H 2018/7338 от 19.09.2022); «Пест-МЛ ПЦР-биочип» для качественного выявления ДНК возбудителя чумы в пробах клинического материала, биологического материала, культур микроорганизмов с одновременным определением принадлежности к основному и неосновным подвидам, биоварам, а также дифференциации вирулентных изолятов от авирулентных (Регистрационное удостоверение No P3H 2021/15445 от 02.09.2022).

Разработанные автором способы молекулярно-генетической дифференциации чумного микроба имеют комплексный научный базис, а их внедрение в практику существенно повышает эффективность микробиологического мониторинга в природных очагах чумы и эпидемиологического надзора за инфекцией. Приоритетность исследований подтверждена двумя патентами на изобретения РФ (No RU 2734636 C1, RU 2799415 C1), зарегистрирована одна программа для ЭВМ 2021612722 RU.

Материалы диссертационного исследования используются при чтении лекций на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

**Личный вклад автора** заключается в определении цели, задач, разработке концепции исследования. Автором непосредственно на основании анализа литературных данных определено состояние вопроса по изучению геномного разнообразия чумного микроба и различных аспектов его индикации и идентификации, отработаны методические подходы и выполнены исследования по сравнительному анализу геномов возбудителя чумы с целью поиска эффективных маркерных ДНК-мишеней для внутривидовой дифференциации *Y. pestis*. На основе анализа сконструированы панели специфических праймеров и зондов для ПЦР-РВ, АС-ПЦР и систем мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом рез ультатов на твёрдой подложке. Эффективность и специфичность комплексной молекулярно-генетической системы дифференциации штаммов *Y. pestis* проверены автором лично на большой выборке природных и клинических штаммов чумного микроба и гетерологичных микроорганизмах.

Разделы исследований по секвенированию геномов *Y. pestis* и разработке биологического чипа выполнялись совместно со специалистами ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

#### **Оценка содержания диссертации, ее завершенность.**

Диссертация оформлена в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, семи глав собственных исследований, включая раздел «Материалы и методы», заключения, выводов и списка использованной литературы, содержащего 102 отечественных и 536 зарубежных источников. Объем диссертации составляет 354 страницы, включает 31 таблицу, 45 рисунков, 8 приложений.

**Во введении** автор убедительно обосновывает актуальность выбранного направления исследований, оценивает степень разработанности проблемы. С учетом этого сформулирована цель работы и определены шесть задач, направленных на ее достижение, охарактеризована научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены выносимые на защиту научные положения.

**В главе 1** «Обзор литературы» проанализировано современное состояние вопроса по изучению внутривидового разнообразия чумного микроба на геномном и фенотипическом уровнях, представлены ретроспективные и современные данные по распространению чумы в мире и обозначены основные направления молекулярно-генетических исследований по индикации, идентификации и типированию возбудителя чумы. В заключении обзора литературы автор отражает актуальные проблемы совершенствования эпидемиологического надзора за чумой с применением современных молекулярных технологий.

**В главе 2** представлена информация по материалам и методам исследования. В качестве объекта исследования использована масштабная выборка из 262

штаммов *Y. pestis*, выделенных в природных очагах чумы в России и сопредельных государствах, а также 35 штаммов гетерологичных микроорганизмов из коллекции ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Работа выполнена с применением широкого спектра методов – бактериологического, молекулярно-генетического (включающего ПЦР, секвенирование, анализ ДНК с использованием биочипов), биоинформатического, статистического. Необходимо отметить, что ряд методов – АС-ПЦР, ПЦР-РВ, анализ ДНК с использованием биочипов реализовывался на основе разработанных автором подходов, панелей праймеров и зондов, программ для анализа результатов, что несомненно подчеркивает высокий исследовательский потенциал автора по совершенствованию методологических аспектов молекулярной диагностики инфекционных болезней.

**Глава 3** посвящена изучению популяционной структуры штаммов *Y. pestis* группы неосновных подвидов (кавказского, улегейского, центральноазиатского), распространенных в природных очагах чумы России и сопредельных стран.

По результатам анализа 1625 коровых однонуклеотидных полиморфизмов в геномах 28 штаммов чумного микроба кавказского подвида при филогенетической реконструкции идентифицировано три эволюционных ветви – I, II (с тремя подветвями) и III, кластеризующихся по филогеографическому принципу. Специфические для отдельных ветвей SNP были использованы в качестве мишеней для разработки набора праймеров, обеспечивающих определение принадлежности штаммов к отдельным филогенетическим ветвям кавказского подвида методом фрагментного секвенирования.

Что касается штаммов чумного микроба улегейского и центральноазиатского подвидов, то в отношении них также проведены филогенетические исследования структуры популяций на основании анализа 1581 и 2221 коровых полиморфизмов, соответственно. Выявлены закономерности географического распространения отдельных филогенетических линий указанных подвидов возбудителя *Y. pestis*.

Значимым результатом исследования в данном направлении является идентификация специфических мутаций в генах факторов патогенности у чумного микроба неосновных подвидов, что может быть причиной избирательной вирулентности данных групп штаммов. Однако это предположения требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

**В главе 4** приводятся результаты исследований по разработке способа детекции и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов, в том числе отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида, методом ПЦР-РВ – создание Набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ». В данном Наборе реагентов в качестве маркеров для индикации присутствия чумного

микроба в образце был определен видоспецифический хромосомный маркер *yihN*, для дифференциации штаммов основного подвида *Y. pestis* – делеция в нуклеотидной последовательности гена *ilvN*, для дифференциации алтайского биовара – характерная делеция 90 п.н. в локусе AK38\_1327. Проведенные клинические испытания набора реагентов подтвердили его высокую диагностическую эффективность, что позволило провести регистрацию в установленном порядке (регистрационное удостоверение No P3H 2018/7338 от 19.09.2022.).

Исследования, представленные в **Главе 5**, направлены на изучение филогенетического разнообразия штаммов восточного биовара основного подвида ветви 1.ORI2 во Вьетнаме. Автором показано, что штаммы чумного микроба в природных очагах на данной территории представлены тремя филогенетическими ветвями, определены направления распространения чумного микроба восточного биовара во Вьетнаме в период третьей пандемии.

**Глава 6** посвящена созданию способа индикации и идентификации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к виду, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности с помощью системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке в формате биочипа. Для исследования определено 18 мишеней ДНК, специфичных для определенных групп штаммов и носящих преимущественно характер инсерций/делеций. Показана высокая специфичность гибридизации на твердой подложке амплифицированных целевых участков ДНК. Разработка на этом этапе подтверждена патентом на изобретение «Способ индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям и по наличию генов основных факторов патогенности методом ДНК-чипа» (No RU 2734636 C1).

На основании результатов экспериментальных исследований сконструирован «Набор реагентов для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной ПЦР в формате биочипа (Пест-МЛ ПЦР -биочип)», который обеспечивает индикацию возбудителя чумы, определение основных плазмид и дифференциацию штаммов античного (с отдельным выделением ветвей 1.ANT (вместе с 1.IN) и 2.ANT)), средневекового (с отдельным установлением принадлежности к филогенетической ветви 2.MED0) и восточного биоваров основного подвида. Набор реагентов прошел клинические испытания и зарегистрирован в установленном порядке (регистрационное удостоверение No P3H 2021/15445 от 02.09.2022).

**В Главе 7** представлены результаты разработки способа внутривидовой дифференциации методом аллель-специфических ПЦР-РВ основных

филогенетических ветвей *Y. pestis*, для которых не были идентифицированы эффективные маркерные indel-мутации. Приоритетность разработки подтверждена Патентом на изобретение «Способ определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени» No RU 2799415 C1.

Систематизация подходов к молекулярно-генетической индикации, идентификации, определению филогенетических ветвей штаммов чумного микроба представлена в **Главе 8** диссертационного исследования.

Автором предложена комплексная система молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*, на первом этапе которой предлагается проведение индикации возбудителя с использованием сконструированных ранее праймеров и зондов, на втором – установление принадлежности изучаемых штаммов *Y. pestis* к подвидам (основному, кавказскому, улегейскому, центральноазиатскому, в том числе алтайскому, гиссарскому, таласскому и *microtus* биоварам центральноазиатского подвида) с помощью детекции indel-мутаций методом ПЦР-РВ или с использованием системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке, на третьем этапе – установление принадлежности штаммов возбудителя чумы к филогенетическим ветвям 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED4, 1.IN1, 1.ORI1, 1.ORI2 и 1.ORI3 с помощью АС-ПЦР-РВ.

**В заключении** автор проводит системный анализ результатов изучения филогенетической структуры популяций *Y. pestis* в природных очагах чумы, акцентирует внимание на отдельных этапах предлагаемой системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов чумного микроба и определяет перспективные направления дальнейших исследований по фундаментальным направлениям изучения молекулярных основ патогенности возбудителя чумы, а также прикладным аспектам совершенствования системы диагностики и эпидемиологического надзора за чумой.

**Выводы** вытекают из основных результатов исследования и согласуются с поставленными задачами. Отдельные из них (вывод 1, вывод 2) перегружены информацией, логично было бы часть заключений из них представить в виде самостоятельных выводов.

**Автореферат** полностью отражает содержание диссертационной работы, в нем лаконично и емко представлены полученные автором результаты, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

По теме диссертации опубликовано 29 печатных работ, из них 13 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК.



В процессе рецензирования работы возник ряд вопросов, требующих уточнения:

1. В Главе 6 на этапе экспериментальных исследований по разработке способа индикации и идентификации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к виду, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям в мультиплексных ПЦР с учетом результатов в формате биочипа в качестве мишеней для мультиплексных ПЦР определено 18 локусов, распределенных на шесть реакций. При конструировании МИ «Пест-МЛ ПЦР-биочип» количество локусов сокращено до 12. С чем было связано сокращение количества целевых участков ДНК, не снизились ли возможности по дифференциации штаммов *Y. pestis* в МИ «Пест-МЛ ПЦР-биочип» по сравнению с разработанным ранее и подтвержденным патентом на изобретение «Способом индикации...»?

2. Были ли установлены различия аналитической чувствительности между двумя параллельно рекомендуемыми для дифференциации ряда подвидов чумного микроба (основной, кавказский, центральноазиатский, улегейский) методами – ПЦР-РВ и системой мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке?

3. Хотелось бы узнать мнение диссертанта по тактике применения молекулярно-генетических методов в рамках мониторинга природных очагов чумы: как, по Вашему мнению, следует интерпретировать положительный результат ПЦР (первый этап – индикация генетических детерминант чумного микроба) в пробе при отсутствии выделения культуры чумного микроба из данной пробы? Целесообразно ли в таком случае подключить второй этап исследования согласно предложенной Вами системе молекулярно-генетического анализа чумного микроба для подтверждения полученных на первом этапе результатов?

4. Вами выдвинута гипотеза о том, что штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида из Уландрыкского мезоочага Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы являются более ранней ветвью эволюции в структуре указанного биовара. Проводились ли в работе исследования по датированной филогении с целью выяснения времени дивергенции выделенного Вами в самостоятельный подвид варианта чумного микроба – штаммов цинхайского подвида филогенетической линии 0.РЕ10?

### **Заключение**

Диссертационная работа Никифорова Константина Алексеевича «Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*» является самостоятельным, завершенным

научно-квалификационным исследованием, в котором решены фундаментальные вопросы совершенствования таксономии *Y. pestis*, филогенетического разнообразия и закономерностей распространения чумного микроба, а также научно обоснована комплексная система дифференции патогена. По актуальности проблемы, научной новизне, теоретической и практической значимости, методическому уровню диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 18.03.2023), а ее автор Никифоров Константин Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

**Официальный оппонент**

доктор медицинских наук  
заместитель директора по научной и  
лабораторно-диагностической работе  
Федерального казенного учреждения  
здравоохранения «Иркутский ордена  
Трудового Красного Знамени научно-  
исследовательский противочумный институт  
Сибири и Дальнего Востока» Федеральной  
службы по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека **Миронова Лилия Валерьевна**

Почтовый адрес: 664047 г. Иркутск, Трилиссера, 78;  
тел. 8(3952) 239985, 89149166564  
e-mail: [mironova-lv@yandex.ru](mailto:mironova-lv@yandex.ru)



Подпись Мироновой Л.В. заверяю  
Ученый секретарь того же института



**Грухина Анна Гавриловна**

28.11.2023