

Отзыв

на автореферат диссертации 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. На территориях природных очагов чумы Российской Федерации, сопредельных государств и стран дальнего зарубежья циркулируют штаммы *Yersinia pestis* разных подвидов, биоваров и филогенетических ветвей (Попов с соавт., 2022 и др.). Распространение в таких очагах различных популяций чумного микроба осложняет дифференциацию и типирование при проведении микробиологического мониторинга. Учитывая вышесказанное, не вызывает сомнения актуальность выбранного Никифоровым Константином Алексеевичем направления исследований по разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к определенным подвидам, биоварам и филогенетическим ветвям.

Цель исследования состояла в разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* для повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы на основании данных филогенетического анализа штаммов чумного микроба.

Для достижения цели автором были поставлены и успешно решены шесть **задач исследования**, адекватных и достаточных для достижения поставленной цели. По результатам филогенетического анализа штаммов кавказского и улегейского подвидов из очагов РФ и сопредельных государств определена их современная популяционная структура и установлено, что штаммы линии O.PE2 кавказского подвида делятся на три независимые ветви. В составе линии O.PE5 улегейского подвида выявлено две ветви эволюции. Разработаны способы определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям улегейского и кавказского подвидов.

Никифоровым К.А. установлено, что центральноазиатский подвид образован 4 биоварами: алтайским, гиссарским, таласским и *microtus*. Штаммы из китайской провинции Цинхай, ранее относимые к линии O.PE4, выделены в самостоятельный подвид - *ssp. ginghaica* и отдельную линию O.PE10. Разработан эффективный способ дифференциации штаммов центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ.



Разработана ПЦР тест-система позволяющая проводить детекцию и дифференциацию штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов, включая отдельно алтайский биовар центральноазиатского подвида.

В результате проведенных исследований Никифоровым К.А. установлено, что штаммы *Y. pestis* из природных очагов чумы Социалистической Республики Вьетнам делятся на три основные филогенетические ветви 1.OR11vi, 1.OR12vi, 1.OR12v. С помощью разработанного комплекта праймеров для дифференциации штаммов из СРВ определены ареалы SNP-генотипов. Показаны направления распространения *Y. pestis* восточно биовара в СРВ в период третьей пандемии чумы.

Результаты исследований реализованы в виде системы мультиплексных ПЦР с гибридационнофлуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности, с использованием 18 ДНК-мишеней.

В процессе выполнения работы изготовлен набор реагентов для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной ПЦР в формате биочипа.

Для проведения внутривидовой дифференциации штаммов филогенетических ветвей *Y. pestis* 0.ANT3, 0.ANT5, 3.ANT, 4.ANT, 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED4, 1.IN1, 1.OR11, 1.OR12, 1.OR13 разработан комплекс аллель-специфических ПЦР с учетом в режиме реального времени.

Благодаря проведенным Никифоровым Н.А. исследованиям научно обоснована и разработана комплексная система молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанная на совокупности методов (ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и системе мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке), обеспечивающих дифференциацию подвигов и биоваров *Y. pestis* с различной эпидемиологической значимостью.

Научная новизна исследования. Диссертационная работа Никифорова К.А., несомненно, имеет научную новизну. Впервые штаммы из провинции Цинхай (Китай) выделены в отдельный цинханский подвид *ssp. ginghaica* и новую филогенетическую ветвь O.PE10. Разработан новый эффективный способ дифференциации штаммов *Y. pestis* центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ.

Получены новые данные о филогенетическом разнообразии штаммов кавказского подвида природных очагов Кавказа и Закавказья. Установлено наличие нескольких обособленных филогенетических ветвей *Y. pestis spp.*



caucasica, соответствующих с распространением штаммов на территориях природных очагов в этих странах.

Получены приоритетные данные по популяционной структуре штаммов *Y. pestis* spp. *ulegeica* филогенетической линии O.PE5, состоящей из двух ветвей эволюции: O.PE5-1 из южных и центральных районов и O.PE5-2 – из западных районов Монголии.

Впервые проведен молекулярно-генетический анализ популяционной структуры восточного биовара основного подвида *Y. pestis* (1.OR1). Выявлено наличие специфической ветви 1.OR12v, к которой относится большая часть штаммов из природных очагов чумы Вьетнама. Впервые представлена научно обоснованная теория циркуляции штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей в СРВ и проведено районирование территории Вьетнама по распространению SNP-генотипов.

Научно обоснована и разработана комплексная система молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанная на широком использовании методов ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для быстрого анализ в рамках проведения микробиологического мониторинга.

Результаты проведенных исследований имеют **теоретическую значимость** и выраженную **практическую** направленность. Особую теоретическую ценность настоящего исследования представляет сформированная автором концепция усовершенствования классификации штаммов *Y. pestis*, согласно которой выделяется семь подвигов: основной, тибетский, кавказский, ангольский, центральноазиатский, улегейский и новый – цинханский. Большой интерес имеет сформулированная гипотеза о том, что штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида из Уландрыкского мезоочага представляют собой наиболее эволюционно раннюю ветвь эволюции *Y. pestis* этого биовара. Особого внимания заслуживает научно обоснованная теория циркуляции и распространения штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей восточного биовара основного подвида в СРВ.

Практический аспект диссертации реализован в виде подобранных комплектов праймеров для дифференциации основных ветвей эволюции *Y. pestis* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Зарегистрированные Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения РФ медицинских изделий *in vitro* наборы реагентов: «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» и «Пест-МЛ ПЦР-биочип», необходимы для исследования клинического материала особенно в случаях невозможности



выделения культуры. Вышеуказанные наборы реагентов могут применяться для детекции ДНК возбудителя чумы в пробах биологического материала и объектах окружающей среды.

В работе использован соответствующий современным требованиям дизайн исследования. Этапы исследования и объём исследования чётко структурированы.

О **достоверности полученных результатов** исследования свидетельствует репрезентативный объём проанализированных данных и их адекватный статистический анализ. Эксперименты, результаты которых представлены в диссертационной работе, выполнены на основе комплексного использования микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических методов.

Диссертационная работа Никифорова К. А. изложена на 354 страницах машинописного текста, и состоит из: введения, 8 глав, заключения, выводов, и 8 приложений. Работа иллюстрирована 31 таблицей и 45 рисунками. Список литературы содержит 102 отечественных и 536 зарубежных источников.

Научные положения диссертации соответствуют пунктам **паспорта специальности** 1.5.11 – микробиология. Степень и достаточность **личного вклада** автора не вызывают сомнений.

В разделе «Заключение» автор обосновывает и доказывает основные положения, выносимые на защиту.

Семь выводов изложены предельно чётко, лаконично, демонстрируют факт достижения поставленной цели исследования и полностью соответствуют полученным автором результатам.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней»

Таким образом, исследование, проведенное Никифоровым К.А. на тему «Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*» является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в теорию и практику микробиологии. По актуальности, новизне полученных данных, внедрению результатов исследования, диссертационная работа Никифорова К.А. полностью соответствует требованиям п. 9: «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертационным работам на соискание



ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология, а ее автор Никифоров Константин Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по заявленной специальности.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биомоделей Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15, Тел. /факс: (865 2) 26-40-05, e-mail: stavnipchi@mail.ru

доктор медицинских наук

Зайцев Александр Алексеевич

Подпись доктора медицинских наук
Зайцева Александра Алексеевича, заверяю

Начальник отдела кадров Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Садагет Мамед кызы Исмаилова

26.10.2023 г.

Адрес: 355035, Российская Федерация, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15,
Тел. /факс: (865 2) 26-40-05, e-mail: stavnipchi@mail.ru

