

УТВЕРЖДАЮ

Начальник федерального государственного
бюджетного учреждения «48 Центральный
научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской
Федерации

доктор биологических наук, профессор,
академик РАН



С.В.Борисевич

2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Никифорова Константина Алексеевича на тему:
«Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-
генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*», представленную
на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности
1.5.11 «Микробиология»

Целью исследований, предпринятых автором рецензируемой диссертации, являлось проведение научно-методического обоснования и разработки комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis* для повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы.

Необходимо отметить, что чума, относящаяся к особо опасным инфекциям, представляет собой серьезную угрозу биологической безопасности Российской Федерации (РФ) и в настоящее время. В ряде природных очагов РФ постоянно регистрируется эпизоотическая активность, которая может привести к заболеванию чумой. Распространение в таких очагах штаммов подвидов, обладающих разной эпидемической значимостью и степенью вирулентности, осложняет дифференциацию и типирование *Y. pestis* в рамках проводимого эпидемиологического мониторинга. Кроме того, существует опасность заноса штаммов *Y. pestis* на территорию России из стран ближнего и дальнего зарубежья. При наличии огромного внутривидового разнообразия *Yersinia pestis* крайне необходим инструментарий для выявления генетических особенностей циркулирующих

штаммов и проведения эффективного мониторинга, а также для проведения исследований молекулярной эволюции возбудителя чумы.

При этом популяционные структуры центральноазиатского, кавказского, улегейского подвидов *Y. pestis*, достаточно широко распространенных на территории природных очагов России и сопредельных государств, до настоящего времени изучены недостаточно, что затрудняет установление молекулярно-генетических причин их избирательной вирулентности и выявление путей формирования и направлений эволюции возбудителя чумы.

Кроме того, в международных базах данных отсутствуют полногеномные последовательности штаммов, выделенных во время третьей пандемии чумы на территории Социалистической Республики Вьетнам, и поиск их генетических особенностей важен для понимания путей распространения и сопутствующих изменений генома возбудителя чумы.

В связи с изложенным, **актуальность** темы диссертации не подлежит сомнению и определяется необходимостью молекулярно-генетического анализа популяционной структуры центральноазиатского и других неосновных подвидов *Y. pestis*, встречающихся на территории России и сопредельных государств, а также изучения филогенетического разнообразия штаммов *Y. pestis* восточного биовара основного подвида из Социалистической Республики Вьетнам.

Для достижения поставленной цели автором сформулированы шесть задач, которые в ходе теоретических и экспериментальных исследований были решены.

Новизна полученных результатов, научных положений, выводов и рекомендаций состоит в следующем.

Получены новые данные о глобальном генетическом разнообразии *Y. pestis* с учётом филогеографических популяций из природных очагов РФ и сопредельных государств. Определена популяционная структура центральноазиатского подвида возбудителя чумы *ssp. central asiatica* из центральноазиатской зоны природной очаговости чумы в России, Монголии и Китае. Разработан эффективный способ дифференциации штаммов возбудителя чумы центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. Впервые штаммы из провинции Цинхай (Китай) определены в отдельный цинхайский подвид *ssp. qinghaica* и новую филогенетическую линию. На основе этого проведено уточнение внутривидовой классификации *Y. pestis*, в соответствии с которой вид *Y. pestis* включает семь отдельных подвидов, включая цинхайский. Впервые обнаружена уникальная для штаммов

центральноазиатского подвида мутация в гене *ybtS*, которая может быть связана с их избирательной вирулентностью.

Получены новые данные о филогеографическом разнообразии штаммов кавказского подвида природных очагов Кавказа и Закавказья в России, Азербайджане, Армении и Грузии. Установлено наличие нескольких обособленных филогенетических ветвей *Y. pestis* ssp. *caucasica*, соотносящихся с распространением штаммов на территории природных очагов вышеупомянутых стран. Предложен способ установления принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям кавказского подвида методом фрагментного секвенирования. Обнаружены специфические мутации в ряде генов, которые могут быть причиной избирательной вирулентности штаммов кавказского подвида.

Получены новые данные по популяционной структуре штаммов *Y. pestis* ssp. *ulegeica*. Найдена специфическая замена единичного нуклеотида в гене фактора патогенности *uscQ*, которая может лежать в основе избирательной вирулентности штаммов этого подвида. Создан способ установления принадлежности штаммов возбудителя чумы к отдельным филогенетическим ветвям улегейского подвида методом фрагментного секвенирования.

Научно обоснована методология и разработан способ установления принадлежности штаммов возбудителя чумы к отдельным подветвям и кластерам алтайского биовара центральноазиатского подвида методом фрагментного секвенирования.

Впервые проведён молекулярно-генетический анализ популяционной структуры восточного биовара основного подвида *Y. pestis* из очагов чумы Социалистической Республики Вьетнам согласно данным полногеномного секвенирования. Впервые представлена научно обоснованная теория циркуляции штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей в Социалистической Республики Вьетнам и проведено районирование территории Вьетнама по распространению SNP-генотипов. Разработан комплекс праймеров для дифференциации штаммов из Социалистической Республики Вьетнам методом фрагментного секвенирования.

На основании выполненного сравнительного анализа полногеномных последовательностей штаммов возбудителя чумы найдены ДНК-мишени – единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNPs), уникальные для различных филогенетических ветвей *Y. pestis*, и разработан комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ, позволяющих проводить внутривидовую дифференциацию всех основных филогенетических групп *Y. pestis*. Новизна исследований подтверждена патентом на изобретение RU 2799415 С1.

По результатам анализа 18 ДНК-мишеней на примере использования 114 штаммов *Y. pestis*, относящихся к разным подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям впервые научно обоснован и разработан способ индикации и идентификации штаммов согласно их принадлежности к виду *Y. pestis*, отдельным подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а кроме того по наличию основных генов патогенности на основе использования системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. Разработана программа по учёту результатов мультиплексного анализа на биологическом микрочипе для выявления и дифференциации штаммов чумного микроба (патент № 2021612722 RU). Научно обоснована возможность индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы согласно их принадлежности к виду *Y. pestis*, к отдельным подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям и по наличию у них генов основных факторов патогенности методом ДНК-чипа (патент RU 2734636 C1).

Научно обоснована и разработана комплексная система молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*, которая основана на применении методов ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке для проведения быстрого и надёжного анализа в рамках проведения микробиологического мониторинга.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, **достоверны**, что определяется применением современных методов экспериментальных исследований, адекватных объекту, поставленной цели и решаемым задачам; общепринятых методов статистической обработки экспериментальных данных; соответствием полученных результатов современным положениям микробиологии, молекулярной генетики, эпидемиологии, теории эволюции.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на девяти российских и международных научно-практических конференциях (2018-2022 гг.).

Значимость полученных автором диссертации результатов для развития микробиологии, молекулярной генетики чумного микроба и эпидемиологии чумы состоит в следующем.

Усовершенствована классификация штаммов *Y. pestis*, согласно которой выделяется семь подвигов, включая вновь охарактеризованный цинхайский, *ssp. qinghaica*. На основе данных полногеномного секвенирования определена популяционная структура древних подвигов *Y. pestis* – кавказского,

центральноазиатского, улегейского; выявлены различия в генах факторов патогенности.

Найдены мутации в ряде генов, кодирующих факторы патогенности, у штаммов центральноазиатского подвида, которые могут быть причиной их авирулентности для человека.

Полногеномное секвенирование с последующим анализом полиморфизма единичных нуклеотидов (SNPs) центральноазиатского и других неосновных подвидов возбудителя чумы позволили установить популяционную структуру и уточнить ареалы распространения названных групп *Y. pestis* в очагах Восточной Европы и Центральной Азии.

На основе филогенетического анализа штаммов, выделенных на территории Социалистической Республики Вьетнам, получены новые данные по распространению и направлению эволюции *Y. pestis* восточного биовара в период третьей пандемии чумы. Предложена научно обоснованная теория циркуляции и распространения штаммов *Y. pestis* на территории Социалистической Республики Вьетнам и разработан комплекс праймеров для их дифференциации, основанный на детекции маркерных SNPs методом фрагментного секвенирования.

Практическая значимость результатов исследований заключается в разработке комплектов праймеров для идентификации штаммов, выделенных из природных очагов чумы, с использованием метода аллель-специфической ПЦР-РВ с установлением их принадлежности к отдельным филогенетическим ветвям, а также прогнозирования их вирулентности, в том числе при необходимости оперативного расследования случаев чумы, а также в создании двух наборов реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы, официально зарегистрированных Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения Российской Федерации как медицинские изделия для *in vitro* диагностики: «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7338 от 19.09.2022) и «Пест-МЛ ПЦР-биочип» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15445 от 02.09.2022).

Результаты диссертационной работы **реализованы** в следующих нормативно-технических и инструктивно-методических документах:

технических условиях по изготовлению наборов реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» (ТУ 21.20.23-054-01898109-2017) и «Пест-МЛ ПЦР-биочип» (ТУ 21.20.23-056-01898109-2020) и инструкциях по применению данных медицинских изделий.

В NCBI GenBank депонированы полногеномные нуклеотидные последовательности 48 штаммов *Y. pestis*.

Результаты диссертационного исследования применяются в работе Противочумного центра и Противочумных институтов Роспотребнадзора, что подтверждается актами внедрения. Материалы диссертации используются также при чтении лекций на курсах специализации при ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Результаты и выводы, приведенные в диссертации, **рекомендуется использовать** в научно-исследовательских учреждениях, организациях и лабораториях при индикации и идентификации возбудителя чумы, оперативном расследовании случаев чумы, проведении исследований генетики вирулентности и филогенеза чумного микроба.

Основные результаты диссертации **опубликованы** в 29 печатных работах, из них 13 – в периодических изданиях, входящих в перечень рекомендуемых ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук, одна публикация в зарубежном журнале, 12 публикаций в сборниках и материалах конференций; к публикациям относятся также 2 патента на изобретения РФ и одна программа для ЭВМ. Материалы диссертации включены в три коллективные монографии, опубликованные в 2019-2022 гг.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы детально изложен во введении к диссертации и в автореферате, отмечены соисполнители работ, выполненных в соавторстве.

Диссертация представлена на 354 страницах машинописного текста, построена по традиционной схеме, включает введение, 8 глав теоретических и экспериментальных исследований, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов, список использованной литературы, включающий 638 источников, и 8 приложений.

В автореферате диссертации Никифорова К.А. изложены основные идеи работы и выводы по ней, показан вклад автора в проведенное исследование, степень новизны и практическая значимость приведенных результатов исследований, содержатся сведения об организации, в которой выполнялась диссертация, об оппонентах и ведущей организации, о научном консультанте соискателя ученой степени, приведен список публикаций автора диссертации, в которых отражены основные научные результаты диссертации.

Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с требованиями ГОСТа Р.7.0.11-2011, написаны грамотно, хорошим литературным языком. Встречаются немногочисленные ошибки (опечатки) (на стр. 8, 12, 242, 244), что не снижает общей положительной оценки диссертации.

Анализ материалов, изложенных в диссертации, позволяет сделать заключение о том, что тема диссертации актуальна, научные положения,

выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, **обоснованы** теоретически и экспериментально, их достоверность и новизна не вызывают сомнения. Диссертация обладает внутренним единством и свидетельствует о личном вкладе соискателя в решаемую научную проблему.

В целом, рассматриваемую диссертацию можно охарактеризовать как научно-квалификационную работу, в которой содержится решение **научной проблемы** обоснования и разработки комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*, имеющей важное значение для развития микробиологии, молекулярной генетики чумного микроба и эпидемиологии чумы.

Заключение: диссертация Никифорова Константина Алексеевича на тему «Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 «Микробиология», соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 № 101, с изменениями, внесенными постановлением Правительства Российской Федерации от 26.05.2020 г. № 751, установленным для диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 «Микробиология».

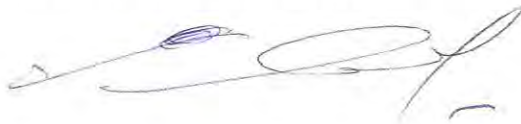
Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании научно-технического совета федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, протокол № 1 (974) от 5 февраля 2024 г.

Отзыв составили:

Главный научный сотрудник научно-исследовательского управления филиала федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров);
610000, город Киров, Октябрьский проспект, дом 119;
телефон: 8-8332-64-75-18; e-mail: 23527@mil.ru;
доктор медицинских наук, профессор

Дармов Илья Владимирович

Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела
филиала федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров);
610000, город Киров, Октябрьский проспект, дом 119;
телефон: 8-8332-64-75-18; e-mail: 23527@mil.ru;
доктор биологических наук, профессор

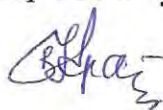


Янов Сергей Николаевич

Подписи Дармова И.В. и Янова С.Н. заверяю.

Ученый секретарь научно-технического совета
федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

«05» февраля 2024 г.



Краснянский Владимир Павлович