

В диссертационный совет
64.1.006.01 по защите диссертаций
на соискание учёной степени кандидата наук,
на соискание учёной степени доктора наук
при Федеральном казённом учреждении науки
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителя и благополучия человека

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук Бывалова Андрея Анатольевича на диссертационную работу **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 темы диссертационной работы.

В настоящее время отмечается увеличение числа случаев опасных инфекционных болезней, что в условиях глобализации, тесных связей и активного перемещения людей между странами, свидетельствует об угрозе распространения возбудителей этих болезней по всему миру. Эта угроза ставит перед системами здравоохранения задачу по постоянному усовершенствованию методов противодействия чрезвычайным эпидемическим ситуациям. В частности, в перманентном совершенствовании нуждается лабораторная диагностика особо опасных инфекций. К одним из патогенов, способным вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения, относится возбудитель чумы *Yersinia pestis*,

штаммы которого отличаются по степени вирулентности и биохимическим свойствам.

В связи с вышеизложенным, диссертационное исследование Никифорова Константина Алексеевича посвящено одному из актуальных направлений исследований в области совершенствования средств и методов противоэпидемических мероприятий, а именно научно-методическому обоснованию и разработке комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis* для повышения эффективности микробиологического мониторинга в очагах чумы.

Новизна исследования.

Автором были получены новые данные, касающиеся генетического разнообразия штаммов *Y. pestis* с учётом филогеографических популяций из природных очагов чумы России и сопредельных государств. Выполнено уточнение внутривидовой классификации *Y. pestis* с выделением семи отдельных подвидов, отличающихся по эпидемической значимости. Уточнены популяционные структуры центральноазиатского подвида *Y. pestis*, кавказского подвида природных очагов России, Азербайджана, Армении и Грузии. Впервые установлена популяционная структура улегейского подвида *Y. pestis*. Найдены мутации в генах факторов патогенности, специфичные для штаммов центральноазиатского, кавказского и улегейского подвигов. Также разработаны способы определения принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям внутри этих подвигов. Впервые был выполнен молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis* из очагов чумы Вьетнама, а также сформулирована научная теория циркуляции штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей во Вьетнаме. Разработаны комплекс аллель-специфических ПЦР-РВ, дающий возможность выполнять внутривидовую дифференциацию основных филогенетических групп *Y. pestis*, и способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию

основных генов патогенности на основе системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов исследования. В рамках выполнения поставленной цели было сформулировано 6 задач, направленных на проведение филогенетического анализа кавказского, улегейского, центральноазиатского подвидов *Y. pestis*, и штаммов из Вьетнама, а также на разработку способов внутривидовой дифференциации, основанных на ПЦР-РВ, аллель-специфической ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке.

Оформление диссертационной работы, использованные методы исследования и статистической обработки полученных результатов полностью соответствуют поставленным задачам. Основные результаты диссертационной работы и подробный обзор литературы иллюстрированы информативными рисунками и таблицами. Структура диссертации соответствует требованиям, предъявляемым к научным исследованиям уровня докторской диссертации.

Материалы диссертации были апробированы на международных и всероссийских научно-практических конференциях. По теме диссертации опубликовано 29 печатных работ, из них 14 – в рекомендованных ВАК журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата наук», 12 публикаций в сборниках и материалах конференций, 3 патента на изобретения РФ. Материалы диссертации включены в 3 коллективные монографии.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы.

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования Никифорова Константина Алексеевича, углубляют научные знания в области таксономии вида *Y. pestis*. В частности, была усовершенствована классификация штаммов *Y. pestis*, определена популяционная структура кавказского, центральноазиатского, улегейского подвидов и выявлены мутации в генах факторов патогенности, специфичные для этих подвидов. Эти данные обогащают представление о закономерностях пространственно-временной циркуляции и эволюции возбудителя чумы в природных очагах России, стран ближнего и дальнего зарубежья. Проведённый филогенетический анализ штаммов из Вьетнама дал возможность получить новые данные о распространении штаммов *Y. pestis* восточного биовара в период третьей пандемии чумы. Автором разработаны комплекты праймеров для дифференциации основных эволюционных ветвей *Y. pestis* методом аллель-специфической ПЦР с учётом результатов в режиме реального времени, создан способ индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов патогенности на основе системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. В итоге проведённой работы была 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 гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке), обеспечивающих дифференциацию подвидов и биоваров *Y. pestis* с разной эпидемической значимостью. В рамках диссертационного исследования Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения Российской Федерации было зарегистрировано 2 медицинских изделия для *in vitro* диагностики – «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» и «Пест-МЛ ПЦР-биочип».

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Диссертационная работа Никифорова Константина Алексеевича построена по традиционному принципу, изложена на 352 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы обзора литературы, семи глав собственных исследований (в том числе, одной главы с описанием материалов и методов), заключения, выводов и 8 приложений.

Во введении показаны актуальность и степень разработанности темы исследования, сформулированы цель и задачи, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, описаны положения, выносимые на защиту, представлена информация о внедрении результатов и рекомендациях по их использованию, отражён личный вклад автора и связь работы с научными программами, а также указаны российские и международные научно-практические конференции, на которых была проведена апробация работы.

В обзоре литературы подробно рассмотрено внутривидовое генетическое разнообразие штаммов *Yersinia pestis*, систематизированы исторические данные по распространению чумы в мире и данные, подтверждающие её эпидемическую значимость в настоящее время, а также подробно рассмотрены все основные современные молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных болезней. Итогом проведённого обзора литературы стал закономерный вывод об актуальности проведения фундаментальных и научно-практических исследований в данном направлении.

В материалах и методах приведён перечень использованного оборудования и реактивов, описаны методики работы с культурами микроорганизмов, обеззараживания материала, анализа биохимических свойств штаммов *Y. pestis*, выделения нуклеиновых кислот, проведения ПЦР и ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов, фрагментного и полногеномного секвенирования, гибридизации в системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой

подложке, приведены программы, использованные для биоинформационного и статистического анализа экспериментальных данных.

В третьей главе диссертации представлены результаты проведенных исследований по изучению актуальных популяционных структур кавказского, улегейского и центральноазиатского подвидов и поиску генетической детерминированности их избирательной вирулентности. В результате этих исследований установлено значительное филогеографическое разнообразие штаммов *Y. pestis* кавказского, улегейского и центральноазиатского подвидов из природных очагов РФ и сопредельных государствах.

Четвёртая глава диссертации посвящена разработке способа выявления ДНК возбудителя чумы с одновременным определением принадлежности к основному и неосновным подвидам, дифференциацией отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида методом ПЦР-РВ. Итогом этой работы стала государственная регистрация медицинского изделия для *in vitro* диагностики «ГенПест-подвид/алтай-РГФ».

В пятой главе представлены результаты филогенетического исследования многообразия штаммов из Вьетнама, результатом которого явилась реконструкция распространения штаммов возбудителя чумы в этом регионе.

В рамках шестой главы была выполнена разработка способа индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим ветвям, а также по наличию основных генов патогенности с помощью системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке. Следствием этой работы стала государственная регистрация медицинского изделия для *in vitro* диагностики – «Пест-МЛ ПЦР-биочип».

Седьмая глава диссертационного исследования посвящена разработке способа дифференциации штаммов филогенетических ветвей *Y. pestis*, для которых ранее не было найдено эффективных маркерных indel-мутаций. В

итоге был разработан комплекс АС-ПЦР-РВ, позволяющий дифференцировать основные филогенетические ветви *Y. pestis*.

В восьмой главе описан алгоритм применения комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Y. pestis*, основанной на использовании методов ПЦР-РВ, АС-ПЦР-РВ и мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке.

Диссертационная работа содержит большой объём экспериментальных данных, полученных соискателем, которые проиллюстрированы рисунками и таблицами, упрощающими восприятие материала.

Заключение посвящено обобщению полученных результатов исследования, формулированию итога проделанной работы и описанию перспектив для последующих исследований возбудителя чумы.

Выводы, приведённые в диссертации, вытекают из представленных автором экспериментальным данным, являются обоснованными, полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Библиографический указатель насчитывает 638 источников научной литературы, из которых 102 отечественных источника и 536 зарубежных.

Соответствие специальности.

Диссертационное исследование Никифорова Константина Алексеевича соответствует следующим областям паспорта специальности 1.5.11. – Микробиология:

1. Систематика и филогения микроорганизмов.
2. Эволюция микроорганизмов.
11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ.
12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.

Вопросы и замечания по диссертационной работе.

Принципиальных замечаний к работе нет, однако в процессе ознакомления с диссертацией возникло несколько вопросов и замечаний:

1. Планируется ли изучение значимости найденных специфических мутаций в генах факторов вирулентности у неосновных подвидов *Y. pestis* в экспериментах на животных?
2. Каковы, на Ваш взгляд, шансы на выделение новых подвидов в структуре вида *Y. pestis* и, следовательно, следующее усовершенствование классификации?
3. Какие молекулярно-генетические методы вы считаете наиболее перспективными и планируете ли работы по их использованию для дальнейшей идентификации штаммов *Y. pestis*?
4. Будут ли специфичные SNPs, использованные для разработки комплекта аллель-специфической ПЦР-РВ, применяться в системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке, для расширения её возможностей?
5. Почему для оценки специфичности медицинских изделий «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» и «ГенПест-индикация-РГФ» (табл. 4.3) использовались гетерологичные бактерии в концентрации 1×10^4 м.к./мл, лишь на порядок превышающей пороговое значение чувствительности тест-систем.
6. Информативность таблицы 2.2 («Штаммы возбудителя чумы из базы данных NCBI, полногеномные последовательности которых были использованы при выполнении этой работы») была бы выше, если бы были указаны место, год и источник выделения штаммов.

Заключение

Диссертационная работа Никифорова Константина Алексеевича на тему «Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*» соответствует специальности 1.5.11. – Микробиология, медицинские науки, является завершённой научно-квалификационной работой, характеризующейся значительной научной и практической значимостью, содержащей в себе решение задач, имеющих существенное значение для развития

микробиологии и, в частности, последующих фундаментальных исследований возбудителя чумы.

Диссертационная работа Никифорова Константина Алексеевича полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 (ред. от 18.03.2023), а её автор заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Официальный оппонент: Бывалов Андрей Анатольевич

Доктор медицинских наук, профессор по специальности 1.5.11. - Микробиология, заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов Института физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации;

старший научный сотрудник Центра превосходства «Фармацевтическая биотехнология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации



07 ноября 2023 г.

Адрес: 167000 г. Сыктывкар, ул. Первомайская, 50
Телефон 8 (8212) 24-00-85
610000, г. Киров, ул. Московская, д.36,
Телефон: 8 912 701-32-56
Электронная почта: byvalov@nextmail.ru

Подпись Бывалова А.А. заверяю:

Ученый секретарь ИФ ФНИЦ Коми НЦ УрО РАН

к.х.н. Е.А. Тишунетисва



14 ноября 2023 г.