

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.006.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО КАЗЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ
ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26 марта 2024 г. № 3

О присуждении Никифорову Константину Алексеевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора медицинских наук.

Диссертация «Научное обоснование и разработка комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*» по специальности 1.5.11 – микробиология принята к защите 25 сентября 2023г. (протокол заседания № 8) диссертационным советом 64.1.006.01, созданным на базе Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, приказом Минобрнауки России № 903/нк от 6 августа 2015 года с изменениями в составе совета на основании приказов Минобрнауки России № 661/нк от 30 октября 2020 г и № 561/нк от 03 июня 2021 г.

Соискатель Никифоров Константин Алексеевич, 1988 года рождения.

В 2011 г. с отличием окончил ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России по специальности лечебное дело. С 2011 года по настоящее время работает в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Прошел путь от младшего научного сотрудника до руководителя подразделением. В настоящее время возглавляет сектор генной инженерии в отделе микробиологии в ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему «Внутривидовая дифференциация штаммов *Yersinia pestis*» по специальности 03.02.03 –микробиология защитил в 2016 г. в диссертационном совете Д 208.078.02, созданном на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной микробиологии отдела микробиологии Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный консультант: доктор биологических наук, старший научный сотрудник **Ерошенко Галина Александровна**, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты:

Мокроусов Игорь Владиславович, доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики;

Бывалов Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук", заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов;

Миронова Лилия Валерьевна, доктор медицинских наук, Федеральное казенное учреждение 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, заместитель директора по научной и лабораторно-диагностической работе, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, г. Сергиев-Посад, в своем положительном отзыве, подписанном **Дармовым Ильей Владимировичем** доктором медицинских наук, профессором, главным научным сотрудником научно-исследовательского управления и **Яновым Сергеем Николаевичем** доктором биологических наук, профессором, старшим научным сотрудником научно-исследовательского отдела филиала федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров) указала, что принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы нет. В целом диссертация Никифорова Константина Алексеевича является завершенной, научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной проблемы обоснования и разработки комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*, имеющей большое значение для развития микробиологии, молекулярной генетики чумного микроба и эпидемиологии чумы. Результаты научной работы представляют научную и практическую значимость для совершенствования лабораторной диагностики (индикации и идентификации) возбудителя чумы, оперативного расследования случаев заболевания чумой, проведения исследований генетики вирулентности и филогенеза чумного микроба и вносят значительный вклад в обеспечение биологической безопасности России. Диссертация и автореферат полностью соответствуют требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023г. № 101 с изм., внесенными постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 № 751,

установленным для диссертаций на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 «Микробиология».

Соискатель имеет 94 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации опубликовано 32 работы общим объемом 410 страниц (25 п.л.), включая 13 статей в рецензируемых научных изданиях (К1-К2) и 1 статью в зарубежном издании, в 11 из которых Никифоров К.А. является первым автором, 12 тезисов, 2 патента на изобретение, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ и 3 коллективные монографии. Публикации отражают все разделы диссертации. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Наиболее значимые работы:

1. **Никифоров, К.А.** Популяционная структура, таксономия и генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида / **К.А. Никифоров**, О.А. Морозов, Н.Ю. Носов, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 10. – С. 1142-1151.
- 2.. **Никифоров, К.А.** Филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида из очагов Кавказа и Закавказья по данным полногеномного секвенирования / **К.А. Никифоров**, Ж.В. Альхова, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Е.Г. Оглодин, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Генетика. – 2019. – Т. 55, № 4. – С. 398-405.
3. **Никифоров, К.А.** Филогения и историко-географический анализ штаммов *Yersinia pestis* из Вьетнама / **К.А. Никифоров**, Л.М. Куклева, Ж.В. Альхова, Е.Г. Оглодин, М.А. Макашова, Е.А. Нарышкина, Н.П. Гусева, Г.А. Ерошенко, Н.С. Dang, Т.М. Lyong, V.K. Vo, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 98-107.
4. **Никифоров, К.А.** Филогеографический анализ штаммов *Yersinia pestis* улегейского подвида / **К.А. Никифоров**, Л.М. Куклева, Ж.В. Альхова, Е.А. Нарышкина, Н.П. Гусева, Г.А. Ерошенко, Е.Г. Токмакова, С.В. Балахонов, В.В. Кутырев // Генетика. – 2020. – Т. 56, № 7. – С. 783-791.
5. **Никифоров, К.А.** Конструирование системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке для индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы / **К.А. Никифоров**, Д.В. Уткин, М.А. Макашова, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Биотехнология. – 2020. – Т. 36, № 3. – С. 46-56.
6. **Никифоров, К.А.** Конструирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» / **К.А. Никифоров**, Л.М. Куклева, Д.А. Ситмбетов, Н.А. Осина, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 4. – С. 90-95.
7. **Никифоров, К.А.** Штаммы *Yersinia pestis* линии 1.ORI как этиологический агент III пандемии чумы / **К.А. Никифоров** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 3. – С. 23-37.

8. **Никифоров, К.А.** Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis* / **К.А. Никифоров** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 4. – С. 29-40.
9. **Никифоров, К.А.** Анализ пространственной структуры популяции *Yersinia pestis* алтайского биовара центральноазиатского подвида по данным полногеномного секвенирования / **К.А. Никифоров, О.А. Морозов, Г.А. Ерошенко, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Я.М. Краснов, В.М. Корзун, С.В. Балахонов, В.В. Кутырев** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 1. С. 122-129.
10. **Никифоров, К.А.** Конструирование системы аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени для определения филогенетической принадлежности штаммов *Yersinia pestis* / **К.А. Никифоров, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, М.А. Макашова, А.Н. Балыкова, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев** // Биотехнология. – 2022. – Т. 38, № 3. – С. 82-91.
11. **Никифоров, К.А.** Разработка комплексной системы молекулярно-генетической идентификации штаммов *Yersinia pestis* [Текст] / **К.А. Никифоров, Е.Г. Оглодин, М.А. Макашова, А.Н. Балыкова, Д.В. Уткин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. С.126–131.

На диссертацию и автореферат дали положительные отзывы без замечаний:

1. **Твердохлебова Татьяна Ивановна**, доктор медицинских наук, доцент, директор Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;
2. **Григорьева Галина Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора;
3. **Зайцев Александр Алексеевич**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биомоделей Федерального казённого учреждения здравоохранения "Ставропольский противочумный институт "Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;
4. **Саяпина Лидия Васильевна**, доктор медицинских наук, главный эксперт Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
5. **Меринова Людмила Константиновна**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник научного и информационно-

аналитического обеспечения Федерального казенного учреждения здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;

6. В отзыве на автореферат **Анисимова Андрея Павловича**, доктора медицинских наук, заместителя директора по научной работе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека содержится вопрос относительно первого положения, выносимого на защиту, в котором речь идет о семи подвидах чумного микроба и просьба объяснить, чем классификация ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора лучше предложенной ранее (2019 г.) группой авторов в статье «Рациональная таксономия *Yersinia pestis*», при этом рецензент подчеркивает все достоинства выполненного диссертационного исследования.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что **Бывалов Андрей Анатольевич** является признанным специалистом в области микробиологии и физиологии чумы и других иерсиний; **Миронова Лилия Валерьевна** – ведущий специалист в сфере молекулярно-биологических и эпидемиологических исследований, занимающийся вопросами молекулярного типирования патогенов; **Мокроусов Игорь Владиславович** является ведущим специалистом по молекулярной генетике, его научные интересы сосредоточены на вопросах эволюции, филогенетики и филогеографии микроорганизмов; в **ведущей организации** работают высококвалифицированные специалисты, участвующие в решении проблем научно-методического и практического обеспечения лабораторной диагностики и специфической профилактики бактериальных инфекционных заболеваний, в исследовании фундаментальных вопросов микробиологии, в том числе, с использованием молекулярно-генетических методов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана и научно обоснована 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 учётом результатов на твёрдой подложке для быстрого и надёжного анализа в рамках проведения микробиологического мониторинга в природных очагах чумы России, других стран СНГ и сопредельных государств;

предложена гипотеза о том, что штаммы алтайского биовара центральноазиатского подвида из Уландрыкского мезоочага представляют собой наиболее раннюю ветвь эволюции *Y. pestis* этого биовара; найденные мутации в ряде генов факторов патогенности у этих штаммов, позволили сделать предположение о том, что эти мутации могут быть причиной авирулентности для человека штаммов филогенетической ветви 0.РЕ4; научно обоснована теория циркуляции штаммов *Y. pestis* разных генетических ветвей в Социалистической Республике Вьетнам (СРВ), базирующаяся на использовании методологии их дифференциации по принадлежности к генетическим подветвям 1.ОРИ2v, 1.ОРИ2vi, 1.ОРИ2v1-10, послужившая основанием для предположения о том, что занос чумы в СРВ происходил несколько раз и был обусловлен передачей возбудителя инфекции синантропными крысами, обитающими на кораблях, прибывших из Китая, а также сухопутным путём с территории близлежащего природного очага чумы в провинции Юньнань;

доказана эффективность применения предложенной комплексной системы молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* для решения задач микробиологического мониторинга и получения новых сведений о глобальном генетическом разнообразии *Y. pestis* с учётом филогеографических популяций из природных очагов чумы России и сопредельных государств.

введено уточнение внутривидовой классификации *Y. pestis* на основании впервые проведенного выделения штаммов из провинции Цинхай (Китай) в отдельный цинхайский подвид *ssp. qinghaica* и новую филогенетическую линию 0.РЕ10. Согласно уточненной внутривидовой классификации вид *Y. pestis* включает семь отдельных подвидов, отличающихся по эпидемической значимости: основной, кавказский (0.РЕ2), ангольский (0.РЕ3), центральноазиатский (0.РЕ4), улегейский (0.РЕ5), тибетский (0.РЕ7) и цинхайский (0.РЕ10).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны закономерности пространственно-временной циркуляции и эволюции возбудителя чумы в природных очагах России, стран ближнего и дальнего зарубежья, расширяющие представления о филогеографическом разнообразии *Y. pestis* основного и неосновных подвидов и уточняющие ареал распространения различных филогеографических популяций возбудителя; применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс современных микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических методов;

изложены приоритетные данные по популяционной структуре штаммов древних подвидов *Y. pestis* – кавказского, центральноазиатского, улегейского; выявлены отличия в генах факторов патогенности, что может быть использовано для анализа направлений эволюции и молекулярных основ отличий в вирулентности по сравнению с высоковирулентным основным подвидом возбудителя чумы.

раскрыты представления о структурно-функциональной организации геномов древних подвидов чумы, базирующиеся на изучении популяционной структуры и поиске детерминированности избирательной вирулентности неосновных подвидов, распространённых на территории стран СНГ, что позволило установить популяционную структуру этих рано дивергировавших групп *Y. pestis* и уточнить ареалы их распространения в очагах Восточной Европы и Центральной Азии.

изучены распространение и направление эволюции *Y. pestis* восточного биовара в период третьей пандемии чумы;

проведена разработка комплекса аллель-специфических ПЦР-РВ, который вместе с разработанными тест-системами «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» и «Пест-МЛ ПЦР-биочип» обеспечивает проведение дифференциации штаммов *Y. pestis* из различных природных очагов мира.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов

(отдельно алтайского биовара центральноазиатского подвида) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ГенПест-подвид/алтай-РГФ)» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7338 от 19.09.2022); «Набор реагентов для выявления и внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба методом мультилокусной ПЦР в формате биочипа (Пест-МЛ ПЦР-биочип)» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15445 от 02.09.2022); разработаны нормативные документы – технические условия (ТУ 21.20.23-054-01898109-2017 – для «ГенПест-подвид/алтай-РГФ», ТУ 21.20.23-056-01898109-2020 – для «Пест-МЛ ПЦР-биочип») и инструкции по их применению; в международной базе данных NCBI GenBank депонированы полногеномные последовательности 48 штаммов *Y. pestis*;

определены комплекты праймеров для дифференциации основных ветвей эволюции *Y. pestis* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени, востребованные для молекулярно-генетической идентификации штаммов из природных очагов чумы с определением их принадлежности к основным филогенетическим ветвям и для оценки вирулентности;

создан алгоритм автоматического анализа результатов, полученных с помощью системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке, для индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, реализуемый при использовании специально разработанной программы по учёту результатов мультиплексного анализа на биологическом микрочипе для выявления и дифференциации штаммов чумного микроба (свидетельство № 2021612722 RU), способствующий повышению эффективности оперативного расследования случаев чумы в рамках проведения микробиологического мониторинга в природных очагах России, других стран СНГ и сопредельных государств.

представлены и впервые благодаря научному обоснованию разработаны способы 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 и методом ДНК-чипа (патент RU 2799415 C1, патент № RU 2734636 C1).

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты получены на сертифицированном оборудовании с привлечением большого объема фактического материала в повторяющихся экспериментах, с использованием комплекса современных микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических методов;

теория построена на известных закономерностях в биологии, генетики, биохимии, применении современных диагностических методик, компьютерного и статистического анализа и согласуется с опубликованными экспериментальными данными;

идея базируется на анализе и обобщении мирового передового опыта о глобальном генетическом разнообразии *Y. pestis* и его филогеографических популяций в различных природных очагах чумы;

использованы современные, в том числе, авторские диагностические технологии, предполагающие автоматизированный учет и оценку результатов, повышающие экспрессность и чувствительность методов молекулярно-биологического анализа;

установлено совпадение авторских результатов с результатами, представленными ранее в независимых источниках по данной тематике.

Личный вклад соискателя состоит в:

Определении цели и задач исследования; отработке методических подходов; конструировании универсальных праймеров и зондов для быстрой и надёжной идентификации штаммов *Y. pestis* методами ПЦР-РВ и АС-ПЦР-РВ, мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов на твёрдой подложке и фрагментного секвенирования; проверке эффективности разработанной комплексной системы молекулярно-генетической внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* на большой выборке природных и клинических штаммов *Y. pestis* и гетерологичных микроорганизмах; разработке алгоритмов и формулировке теорий и гипотез; определении основных положений и выводов

диссертационной работы. Подготовка основных публикаций по выполненной работе осуществлена как лично автором, так и при его непосредственном участии.

В ходе защиты диссертации были высказаны замечания редакционного характера и задан ряд вопросов.

Соискатель Никифоров К.А. согласился с замечаниями, ответил на все задаваемые вопросы и привёл собственную аргументацию относительно тактики применения молекулярно-генетических методов в рамках мониторинга в природных очагах чумы, внутривидовой классификации *Y.pestis*, дальнейшей эволюции чумного микроба и перспектив исследования в этом направлении.

На заседании 26 марта 2024 года диссертационный совет принял решение за научное обоснование и разработку комплексной системы молекулярно-генетической дифференциации штаммов *Yersinia pestis*, имеющей важное значение для дальнейшего развития микробиологии, молекулярной генетики чумного микроба и эпидемиологии чумы, внедрение которой вносит значительный вклад в обеспечение биологической безопасности Российской Федерации, присудить Никифорову К.А. ученую степень доктора медицинских наук.

При проведении тайного электронного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.5.11 – микробиология (медицинские науки), участвовавших в заседании, из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 23 (20 - очно, 3 - дистанционно), против – нет.

26 марта 2024 г.

Заместитель председателя
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



Попов Юрий Алексеевич

Бугоркова Светлана Александровна