



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ростовский -на- Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)

344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40,
Тел. (863) 240-27-03, Факс: (863) 267-02-23,
E-mail: plague@aanet.ru, Сайт: <http://antiplague.ru>
ОКПО 01898316, ОГРН 1026103278959,
ИНН 6164101841, КПП 616401001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Ростовский-на-Дону
научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора

к.м.н.  С.В.Титова

« 26 » апреля 2019 г.

№ _____ от _____
на № _____ от _____

ОТЗЫВ

Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института как ведущей организации на диссертацию **Агафоновой Елены Юрьевны** «Вариабельность генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Штаммы холерных вибрионов, лишенные генов ключевого фактора патогенности – холерного токсина (СТ) несмотря на неспособность к эпидемическому распространению занимают не последнее место в этиологии острых кишечных инфекций различной степени тяжести – от слабой и умеренной диареи до тяжелых, иногда фатальных холероподобных заболеваний. Их происхождение, пути распространения, филогенетические связи с токсигенными штаммами остаются не вполне понятными, и для получения более полных сведений необходимо изучение их гетерогенных геномов и содержащихся в нем детерминант факторов патогенности и персистенции. Немного известно и о масштабах внутривидового генетического обмена, следствием которого может стать формирование более вирулентных клонов. Кроме того, сведения о структуре генома являются предпосылкой для отбора штаммов с определенным набором генов и их кластеров в целях конструирования на их основе продуцентов антигенов для создания новых диагностических и вакцинных препаратов. Поэтому актуальность представленной к защите диссертации не вызывает сомнений.

Цель работы заключалась в выявлении особенностей структуры генома нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации и сопредельных стран, и их филогенетическом анализе.

В соответствии с целью автором поставлены 4 задачи, которые успешно решены в процессе выполнения работы.

Научная новизна представленных в диссертации результатов состоит в получении приоритетных данных о содержании в геномах нетоксигенных штаммов различных сочетаний мобильных элементов, определяющих их патогенетический потенциал – профагов CTX, RS1φ, TLCφ, острова патогенности VPI-1 и островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Также изучена структура ряда генов факторов патогенности/персистенции коровой области, выявлена их значительная вариабельность. С помощью SNP-типирования показано, что штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ имеют высокий уровень сходства и, вероятно, общее происхождение с токсигенными, тогда как штаммы $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ относятся к двум отдельным филогенетически обособленным группам.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что полученные данные расширяют знания о геномном разнообразии нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулирующих на территории РФ. На основе анализа полногеномных сиквенсов определена современная структура популяций нетоксигенных штаммов биовара Эль Тор из эндемичных и неэндемичных по холере территорий.

На основе полученных фундаментальных данных разработана новая ПЦР-тест-система для дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, потенциально способных и неспособных к реверсии в эпидемически опасные. Приоритетность данного способа подтверждена получением патента на изобретение.

Сконструирован и детально апробирован усовершенствованный генно-инженерный авирулентный штамм *V. cholerae* Эль Тор – эффективный продуцент иммуногенной В1-субъединицы СТ. Штаммы с измененной продукцией CtxВ и термолabileного гемолизина депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

В международной базе данных NCBI GenBank депонированы 30 нуклеотидных последовательностей полных геномов нетоксигенных и 11 токсигенных штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории РФ, Украины, Туркменистана.

По материалам диссертации составлены методические рекомендации «Дифференциация нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор $ctxA^-tcpA^+$ по их эпидемической значимости методом мультиплексной ПЦР», одобренные Ученым советом (протокол №4 от 24.11.2017 г.) и утвержденные директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Полученные данные включены в лекции курсов «Бактериология. Основы безопасности работы с патогенными биологическими агентами I-II группы патогенности».

Степень достоверности и апробации результатов. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании. Все представленные в работе данные получены лично автором либо при его непосредственном участии, их воспроизводимость и достоверность подтверждены в сериях многократных повторностей экспериментов, статистической обработкой и компьютерным анализом.

Материалы диссертации широко представлены на научных конференциях различного уровня, в т.ч. всероссийских и международных, а также в 13 публикациях, в т.ч. 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 135 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 214 работ, из которых 80 отечественных и 134 зарубежных. Текст иллюстрирован 8 таблицами и 19 рисунками.

Во **введении** убедительно показана актуальность проблемы, а также приведена основная информация по результатам диссертационного исследования. Пять положений, выносимых на защиту, отражают основные результаты и достижения работы.

Обзор литературы состоит из двух разделов. В первом проанализированы данные о фено- и генотипических особенностях токсигенных и нетоксигенных штаммов, особое внимание уделено молекулярной структуре основных мобильных элементов, прослежена история их обнаружения и появления в геномах возбудителей. Второй раздел посвящен факторам патогенности и персистенции, которые могут участвовать в патогенезе типичной холеры либо холероподобных диарей (в случаях заражения нетоксигенными штаммами), а также определять конкурентоспособность и возможность длительного сохранения в различных экологических нишах. Диссертантом рассмотрены современные данные о структуре и механизмах действия большинства из них, при этом использованы как «первоисточники», так и публикации последних лет, в которых приведены новые сведения. В целом обзор свидетельствует о широкой эрудиции соискателя и вполне согласуется с задачами, решаемыми при выполнении собственных исследований. Вместе с тем, вызывает сожаление тот факт, что, сосредоточившись на ТСР как рецепторе фага СТХф, автор совсем не приводит данных об альтернативных путях его ТСР-независимой горизонтальной передачи, тогда как такие пути на сегодняшний день известны и описаны в литературе (общая трансдукция целым рядом филаментозных и головчатых фагов, использующих другие рецепторы – O1-антиген, пили MSHA и др.; трансформация в присутствии хитина). Также известен фаг, способный переносить даже VP1 с генами *tcp*. Эти данные значительно расширяют взгляды на потенциальную способность не только *tcp*⁺, но и *tcp*⁻ штаммов холерных вибрионов к приобретению детерминант холерного токсина.

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление о высоком методическом уровне диссертационной работы. Объектами исследования служила выборка из 180 штаммов O1 и неO1/неO139 серогрупп различного происхождения,

в т.ч. нетоксигенных, а также полученные экспериментально. Все методики изложены подробно и достаточно четко. Изучение по фенотипу проводили с использованием в основном традиционных методов с доказанной ранее эффективностью. На наш взгляд, более корректно было бы говорить об определении протеолитической активности штаммов в целом, а не конкретно гемагглютинин/протеазы, поскольку, как известно, при выключении гена *hapA* протеолиз на молоке дают другие протеазы (PrtV, VchC, сериновая и т.п.). Также использован целый ряд молекулярно-биологических методов (конъюгационные скрещивания, транспозонный мутагенез, ПЦР, полногеномное секвенирование, SNP-типирование и др.). Очевидна высокая квалификация автора в микробиологии, так и в молекулярной биологии, включая владение методами биоинформационного анализа и статистической обработки полученных данных.

В главе 3 представлены результаты анализа полногеномных сиквенсов 29 штаммов, предварительно отобранных с помощью ПЦР по содержанию в них разных наборов генов, связанных с мобильными элементами, обеспечивающими их патогенный (CTXφ, RS1φ, TLCφ, VPI-1, VPI-2), эпидемический (VSP-I и VSP-II) и персистентный (EPI) потенциал. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей показал, что в геномах токсигенных штаммов присутствовал полный набор этих мобильных элементов, тогда как среди нетоксигенных из эндемичных по холере регионов наблюдалась значительная гетерогенность, как по их наличию/отсутствию, так и по структуре самих кластеров и входящих в их состав генов. Также был проведен анализ ряда генов коровой части генома – RTX-кластера, *hly*-локуса, гемагглютинин/протеазы, которые оказались не менее гетерогенными. Из этого разнообразия Елена Юрьевна выделила 2 группы нетоксигенных штаммов – $ctxA^- tcpA^+ VSP^-$ и $ctxA^- tcpA^+ VSP^+$ и представителей первой однозначно отнесла к эпидемически безопасным.

Дальнейшие исследования были направлены на выявление штаммов с генотипом $ctxA^- cpA^+ VSP^+$, которые были обнаружены среди изолятов из эндемичных регионов мира. На основании проведенного сравнительного анализа автором представлены убедительные аргументы в пользу происхождения таких штаммов от токсигенных вследствие утраты профага CTX при сохранении остальных перечисленных детерминант. При дальнейшем SNP-анализе полных геномов на построенной дендрограмме они также сгруппировались с токсигенными холерными вибрионами, в то время как $ctxA^- tcpA^+ VSP^-$ и $ctxA^- tcpA^- VSP^-$ образовали 2 отдельных кластера. Полученные данные значительно расширяют представления о внутривидовых филогенетических связях холерных вибрионов и позволяют проследить возможные пути их эволюции.

Глава 4 является логическим продолжением главы 3 и посвящена в основном практическим целям – разработке быстрого информативного способа дифференциации нетоксигенных штаммов на основе мультиплексной ПЦР. Для этого соискателем были отбраны 4 мишени – гены, входящие в состав профага CTX (*ctxA*), острова патогенности VPI (*tcpA*), островов пандемичности VSP-I (VC0180) и VSP-II (VC0514), после чего была проделана огромная трудоемкая работа по оптимизации условий амплификации и оценке специфичности и эффективности разработанного способа. Эти

задачи были успешно решены, представленные данные документированы, хорошо иллюстрированы, их достоверность не вызывает сомнений. Новизна разработанного способа подтверждена получением патента на изобретение.

По итогам данных, представленным в обеих главах собственных исследований, соискатель четко формулирует свою точку зрения на потенциальную эпидемическую опасность нетоксигенных штаммов с генотипом $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ и отсутствие таковой у $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и приводит веские аргументы в ее пользу. Тем не менее, поскольку это положение является дискуссионным, возникают следующие вопросы:

1. Возможность реверсии $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ в эпидемически опасные обоснована данными биоинформационного анализа, показавшего близкое генетическое родство между этими штаммами и токсигенными, и сделано заключение о том, что первые являются производными вторых, утративших профаг СТХ. Учитывая множественность путей эволюции холерных вибрионов, допускаете ли Вы существование «обратного» процесса, т.е. постепенного приобретения всех необходимых мобильных элементов естественными авирулентными обитателями водоемов и не являются ли именно они изначальными предками возбудителей эпидемической холеры?

2. Разработанная на основе анализа геномов довольно большой, но все же ограниченной выборки штаммов ПЦР-система безусловно является еще одним полезным инструментом для типирования холерных вибрионов. Однако их геном имеет мозаичную структуру, и при дальнейшем использовании предложенного способа несомненно будут выявлены штаммы с другими сочетаниями используемых генов, например, содержащие только один из двух островов пандемичности (штаммы $VSP-I^+VSP-II^-$ есть в нашей коллекции, но их сиквенсы еще не депонированы в NCBI) либо делеции части генов внутри них (как известно, протяженная делеция в $VSP-II$ характерна для геновариантов с повышенным эпидемическим потенциалом). Также существуют $ctxA^-tcpA^-VSP^+$ штаммы, такие как выделенные в Азербайджане в 1989 г. от больных с диагнозом «холера» (один из них депонирован нами в ГКПБ «Микроб»). Возбудители крупной эпидемической вспышки в Судане (1968) имели генотип $ctxA^+tcpA^+VSP^-$, и хотя они относились к O37 серогруппе, не исключена возможность выявления этого генотипа у штаммов O1 серогруппы. Как, на Ваш взгляд, следует интерпретировать такие результаты и к какой категории относить штаммы с «нестандартными» наборами генетических детерминант, и предполагается ли в дальнейшем расширение схемы типирования за счет включения дополнительных мишеней?

3. Как отмечено выше, штаммы, лишенные генов tcp , потенциально могут приобрести профаг СТХ альтернативными путями ТСП-независимой горизонтальной передачи, в также остров VPI за счет общей трансдукции некоторыми фагами. По всей видимости, они могут использовать и другие факторы колонизации, поскольку среди них встречаются возбудители тяжелых холероподобных заболеваний, а адгезивная активность некоторых показана экспериментально. Если такое событие произойдет и образуются варианты CTX^+VPI , будет ли зависеть их патогенетический потенциал и способность к распространению от присутствия островов VSP ?

Глава 5 посвящена решению еще одной важной научно-практической задачи – конструированию штамма-продуцента В-субъединицы СТ (CtxB1), препараты которой необходимы для производства иммунодиагностических препаратов и противохолерных вакцин. Для достижения поставленной цели потребовалось 2 этапа. На первом с помощью ненаправленного транспозонного мутагенеза у спонтанного ΔСТХ мутанта были инактивированы гены, ответственные за продукцию гемолизина HlyA. В итоге конюгативного переноса в клетки этого штамма транспозона TnpHoA из донора *E.coli* было отобрано 1200 клонов, и все они были проверены на гемолитичность. Из трех негемолитичных один был использован на втором этапе в качестве реципиента рекомбинантной плазмиды с клонированным геном *ctxB1*, которая также была передана в него посредством конюгативного скрещивания. Этот этап также потребовал длительной трудоемкой работы с тщательным подтверждением всех промежуточных и конечных стадий с помощью ПЦР, секвенирования, рестрикционного анализа, РПИГ и ELISA. Полученный активный продуцент стабильно сохранял рекомбинантную плазмиду даже в отсутствие селективного давления. Он обладал достаточно высоким уровнем ToxT-независимой транскрипции гена *ctxB1*, превышающем таковую у исходного штамма в 16,7 раз, что было установлено с помощью метода обратной транскрипции, однако уровни транскрипции *toxT* и, соответственно, *tcpA* у него снизились. Эффективная экспрессия гена *ctxB1* в клетках продуцента дает возможность использовать его для получения В-субъединицы СТ при изготовлении иммунобиологических препаратов.

В **Заключении** подведены итоги работы, отражены наиболее значимые собственные приоритетные данные и отмечены моменты, требующие дальнейших дополнительных исследований.

Обращает на себя внимание большой объем проделанной работы с использованием самых современных методов исследования, корректное и наглядное представление полученных данных и их грамотное обсуждение, что является показателем научной зрелости соискателя. Высказанные замечания не снижают научной ценности диссертации.

Автореферат и научные публикации, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, отражают основное содержание работы. Автореферат оформлен в соответствии с необходимыми требованиями. Тема и содержание диссертации соответствуют п.2 и п.3 паспорта специальности 03.02.03. – микробиология.

Заключение

Изложенное позволяет заключить, что представленная к защите диссертация Агафоновой Елены Юрьевны «Вариабельность генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой помимо получения ответов на ряд ранее не изученных вопросов решены важные теоретические и научно-практические задачи. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объе-

му и методическому уровню проведенных исследований, качеству изложения и репрезентативности фактического материала работа полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК (от 24 сентября 2013 г., № 842, п.9, 10, 13), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Отзыв обсужден на заседании Ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 25.04.2019 г. (протокол №3).

Ведущий научный сотрудник ФКУЗ
Ростовский-на-Дону противочумный
институт Роспотребнадзора,
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник



Монахова Елена Владимировна

Подпись Монаховой Е.В.

ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора



Стоян Елена Евгеньевна

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора). 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40. Тел. (863) 240-27-03, Факс: (863) 267-02-23, E-mail: plague@aanet.ru , Сайт: <http://antiplague.ru>