

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Агафоновой Елены Юрьевны «Вариабельность генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования. На современном этапе развития общества холера по-прежнему остается актуальной проблемой здравоохранения в мире. По официальным данным ВОЗ за период текущей седьмой пандемии зарегистрировано более 9 млн. случаев заболевания, а в 2017 г. в мире холерой заболело более 1 млн. человек. Ежегодно регистрируются заболевания холерой на эндемичных территориях Азии, Африки, Южной Америки, а также завозы инфекции на свободные от холеры территории с регистрацией там, в ряде случаев, серьезных эпидемических осложнений. Интенсивность эпидпроцесса при холере в период седьмой пандемии во многом определяется особенностями биологических свойств возбудителя, формированием его генетически измененных форм с повышенным патогенным потенциалом, нарастанием антибиотикорезистентности. Такая ситуация послужила основанием для отнесения холеры к одной из инфекционных угроз XXI века и потребовала разработки глобальной дорожной карты по ликвидации холеры. Вместе с тем, следует отметить, что одна из особенностей этиологического агента седьмой пандемии – вибриона Эль Тор – существование нетоксигенных эпидемически безопасных вариантов, лишенных профага СТХ, несущего гены одного из основных факторов патогенности возбудителя – холерного энтеротоксина. Многочисленными исследованиями показана генетическая гетерогенность этих вариантов, в том числе и по наличию в геноме детерминант другого важного фактора патогенности – токсин-корегулируемых пилей адгезии. Штаммы, содержащие эти гены, при отсутствии СТХ профага, обозначенные ранее как потенциально эпидемически опасные, были обнаружены в поверхностных водоемах на территории Российской Федерации, а также от больных с симптомами острой кишечной инфекции и вибрионосителей.

Генетическая вариабельность нетоксигенного холерного вибриона биовара Эль Тор определяет необходимость углубленного изучения его генетической организации, филогенетических взаимосвязей, а также пересмотра подходов к оценке эпидемической опасности обнаруживаемых в ходе микробиологического мониторинга штаммов *V. cholerae* и разработки эффективных тест-систем, основанных на детекции актуальных генетических маркеров.

С учетом этого, диссертационная работа Е.Ю. Агафоновой, цель которой – выявление особенностей структуры генома нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации и сопредельных стран, и их филогенетический анализ, несомненно своевременна и

актуальна. Для достижения поставленной цели автором поставлено четыре задачи, которые последовательно решались в ходе диссертационного исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертационной работы согласуются с поставленными задачами и основаны на большом объеме экспериментальных данных. Исследование проведено комплексно с применением широкого спектра современных молекулярных технологий, результаты проанализированы с использованием методов биоинформатики и стандартной статистической обработки данных.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы определяются проведенным всесторонним изучением генома разных групп нетоксигенных штаммов холерного и сформированными на основании этого выводами об их эпидемической значимости и филогенетических взаимосвязях. Показана дифференциация нетоксигенных штаммов, обнаруживаемых на неэндемичных территориях, на две группы: *ctxA-tcpA-VSP-* и *ctxA-tcpA+VSP-*, тогда как лишенные СТХ профага вибрионы Эль Тор с эндемичных территорий отнесены к третьей группе штаммов с интактными другими мобильными генетическими элементами, определяющими патогенный и пандемический потенциал. Впервые установлена нестабильность структуры острова патогенности VPI-2, заключающаяся в наличии делеций различной протяженности в первых двух группах штаммов, а также вариабельность генов *msh* острова EPI и коровых генов *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, наиболее выраженная в группе *ctxA-tcpA-VSP-* вариантов. На основании полученных результатов автором сделан вывод об эпидемической безопасности *ctxA-tcpA-VSP-* и *ctxA-tcpA+VSP-*, обнаруживаемых на благополучных по холере территориях.

На основе полученных в настоящем исследовании данных разработан новый способ дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор разной эпидемической значимости с электрофоретическим форматом детекции. Новизна способа подтверждена патентом на изобретение.

По данным полногеномного SNP-типирования сделано заключение о том, что нетоксигенные штаммы *ctxA-tcpA+VSP-* и *ctxA-tcpA-VSP-* принадлежат к двум отдельным филогенетически обособленным группам, удаленным как от токсигенных вариантов, так и друг от друга.

Практическая и теоретическая значимость полученных автором результатов.

Несомненное практическое значение в плане совершенствования микробиологического мониторинга холеры имеет разработка автором нового способа определения эпидемической значимости изолированных культур холерного вибриона, предусматривающего детекцию, наряду с ранее используемыми генетическими маркерами (гены *ctxA* и *tcpA*), двух дополнительных генов, локализованных на островах пандемичности.

Ценность представляет сконструированный в рамках данного исследования авирулентный штамм *V. cholerae* биовара Эль Тор, продуцирующий В-субъединицу холерного токсина, который может быть использован для разработки иммунобиологических препаратов.

Кроме того, в Государственную коллекцию патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» депонированы сконструированные автором штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с утраченной продукцией термолabileного гемолизина и высоким уровнем продукции иммуногенной В-субъединицей холерного токсина. В международную базу данных GenBank депонированы последовательности геномов 30 нетоксигенных и 15 токсигенных штаммов холерного вибриона, выделенных на территории РФ, Туркменистана, Украины.

По материалам диссертации подготовлены и утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора методические рекомендации «Дифференциация нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор *ctxA-tcpA+* по их эпидемической значимости методом мультиплексной ПЦР».

Теоретическая значимость исследования заключается в установлении филогенетических взаимосвязей разных групп нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, а также обосновании нового подхода к оценке эпидемической значимости изолируемых культур микроорганизма.

Личный вклад автора заключается в поиске и анализе литературных данных по проблеме, формировании концепции исследования и планировании экспериментов, а также проведении экспериментальных исследований и обработке их результатов. Часть экспериментальных исследований и полногеномное секвенирование выполнено совместно со специалистами ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках плановых комплексных тем НИР.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность.

Диссертация оформлена в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 80 работ отечественных и 134 работы зарубежных авторов. Объем диссертации составляет 135 страниц, включает 8 таблиц и 19 рисунков.

Во введении убедительно обоснована актуальность проведенного исследования, степень разработанности проблемы, определена цель и поставлены задачи, охарактеризованы новизна, теоретическая и практическая значимость, представлены положения, выносимые на защиту.

Глава 1 диссертации посвящена обзору современной отечественной и зарубежной литературы по теме исследования и включает вводную часть, содержащую данные об общих закономерностях микроэволюционных преобразований возбудителя холеры Эль Тор в период седьмой пандемии, а также два раздела, посвященных всестороннему анализу молекулярно-генетических особенностей возбудителя. В первом разделе подробно рассматривается геномная

организация токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с характеристикой мобильных генетических элементов, детерминирующих патогенность и пандемический потенциал возбудителя (CTX профаг, острова патогенности VPI-1 и VPI-2, острова пандемичности VSP-I и VSP-II), и анализом особенностей структуры этих элементов у атипичных геновариантов возбудителя. В отношении нетоксигенных штаммов автором представлена информация о существовании вибрионов Эль Тор, лишенных всех рассматриваемых генетических маркеров патогенности и пандемичности, а также вариантов *ctxA*⁻*tcpA*⁺. Однако, что касается последних вариантов, рассматриваются преимущественно штаммы, циркулирующие на эндемичных территориях, и недостаточно полно охарактеризована ситуация по обнаружению вибрионов Эль Тор с данной генетической структурой в Российской Федерации. Во втором разделе обзора автор приводит характеристику дополнительных факторов патогенности, которые могут играть потенциальную роль в развитии клинической симптоматики острой кишечной инфекции при инфицировании нетоксигенными штаммами холерного вибриона.

В главе 2 представлена информация по материалам и методам, использованным в работе. Обращает на себя внимание значительный объем выборки для проведения экспериментальных исследований, включающей 190 изолятов микроорганизмов рода *Vibrio* и гетерологичных. Методологически автором применен широкий круг как традиционных, так и современных подходов для достижения поставленной цели.

В главе 3 автором последовательно решались задачи по оценке variability геномов нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных на неэндемичных (Россия и сопредельные страны) и эндемичных территориях. На первом этапе был проведен ПЦР-скрининг генов патогенности и пандемичности в нетоксигенных штаммах, выделенных на территории РФ и в сопредельных странах, по результатам которого они дифференцировались на две группы: *ctxA*⁻*tcpA*⁻*VSP*⁻ и *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VSP*⁻. Далее в работе был проведен полногеномный анализ указанных групп штаммов, а также штаммов из эндемичных регионов в качестве группы сравнения. В результате автором подтверждено распределение нетоксигенных штаммов из РФ на две группы. При этом у штаммов холерного вибриона *ctxA*⁻*tcpA*⁻*VSP*⁻ впервые выявлена протяженная делеция острова патогенности VPI-2, что может рассматриваться в качестве их дополнительного генетического маркера. *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с эндемичных территорий отнесены к третьей группе, содержащей в геноме интактные мобильные генетические элементы, за исключением профага CTX (генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VSP*⁺). Последовательности геномов исследованных штаммов депонированы автором в GenBank, однако в диссертационной работе не представлены ссылки на номера проектов депонирования.

Реконструкция филогении на основании SNP в полных геномах позволила автору сделать заключение о том, что нетоксигенные штаммы с генотипом

ctxA-tcpA+VSP+ с эндемичных территорий имеют общее происхождение с токсигенными и, по-видимому, являются их производными, тогда как нетоксигенные штаммы *ctxA-tcpA+VSP-* и *ctxA-tcpA-VSP-* относятся к двум отдельным обособленным филогенетическим группам, отдаленным как от токсигенных штаммов, так и друг от друга. Эти результаты дают основание судить о филогенетических взаимосвязях исследуемых групп штаммов, но оставляют открытым вопрос о происхождении последних двух групп. Автор высказывает мнение о том, что *ctxA-tcpA-VSP-* варианты вибриона Эль Тор не имеют генетической близости с возбудителем холеры, однако, на наш взгляд этот аспект требует дальнейшего исследования с углубленным изучением геномов разных групп штаммов.

В главе 4 диссертант на основании полученных данных о структурных особенностях геномов разных групп нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор проводит разработку способа их дифференциации по эпидемической значимости. В качестве мишеней были выбраны используемые ранее для оценки эпидемической значимости холерного вибриона маркеры – *ctxA* и *tcpA* и дополнительно два гена из состава островов пандемичности – *vc0180* (VSP-I), *vc0514* (VSP-II). Праймеры для детекции одного из генов – *vc0180* рассчитаны автором работы. Конструирование тест-системы осуществлено в мультиплексном двухпробирочном формате с детекцией результатов посредством электрофореза в агарозном геле. Автором определены оптимальные параметры реакции и оценка ее специфичности и возможности дифференциации разных групп штаммов (обозначенная автором как «эффективность») с использованием большой выборки штаммов *V. cholerae*, других представителей рода *Vibrio* и гетерологичных микроорганизмов. В результате установлена 100 % специфичность, а распределение на группы штаммов соответствовало ранее определенным в работе критериям эпидемической опасности: эпидемически опасные, потенциально эпидемически опасные, эпидемически безопасные. Вместе с тем, в данном разделе (таблица 6) недостаточно исчерпывающе представлены возможные варианты результатов реакции и, соответственно, отсутствует их интерпретация. В частности, не представляется возможным определить, как будет проводиться оценка эпидемической значимости при обнаружении детерминант одного из островов пандемичности, при отсутствии другого в нетоксигенных штаммах, содержащих ген *tcpA*.

Следующим направлением исследования, представленным в главе 5, было создание нового авирулентного штамма, продуцирующего В-субъединицу холерного токсина, на основе спонтанного мутанта генетически измененного *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, утратившего гены холерного токсина *ctxAB*. С этой целью последовательно проводился сначала ненаправленный транспозонный мутагенез для инактивации гена гемолизина *hlyA*, а затем введение в клетки нетоксигенного *hlyA-* штамма плазмиды с клонированным геном *ctxB*. Полученный таким способ штамм характеризуется повышенной продукцией В-субъединицы

холерного токсина (6 мкг/мл), стабильность наследования плазмиды в трансконъюгантах составила 95 %. Дополнительный интерес представляет то, что штамм-продуцент относится к генетически измененным вариантам вибриона Эль Тор, которые выступают в качестве актуального на сегодняшний день этиологического агента холеры.

В заключении автор систематизирует полученные результаты, высказывает свою точку зрения на проблему эпидемической значимости разных групп штаммов холерного вибриона и оценивает потенциальную возможность реверсии отдельных вариантов нетоксигенных *V. cholerae* O1 El Tor в токсигенные.

Автореферат диссертации позволяет получить полное представление о проведенном исследовании, основные результаты диссертации отражены в 13 научных работах, из них три в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации и один патент на изобретение. Материалы исследования представлены на международных, всероссийских и региональных научно-практических конференциях, а также Проблемной комиссии 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации.

Следует сказать, что структура диссертации, четко определенная цель, лаконично и емко поставленные задачи, последовательно решенные в ходе выполнения работы с использованием широкого набора современных методов, подходы к всестороннему анализу полученных результатов и сформулированные на основе результатов выводы свидетельствуют о глубоких познаниях Елены Юрьевны в области геномной организации холерного вибриона и филогенетических взаимоотношений разных групп штаммов возбудителя.

Вместе с тем, по результатам ознакомления с работой хотелось бы задать ряд вопросов:

1. Основываясь на каких данных, полученных в настоящей работе, автор приходит к заключению о подтверждении заноса на территорию РФ штаммов *V. cholerae* O1 El Tor с генотипом *ctxA-tcpA+VSP-* (раздел «Теоретическая и практическая значимость работы»)?
2. Известно, что один из островов пандемичности холерного вибриона – VSP-II – на современном этапе пандемии подвергся существенной последовательной трансформации, выражающейся у ранних генетически измененных вариантов *V. cholerae* O1 El Tor наличием короткой делеции, а у более поздних – протяженной, захватывающей локусы *vc0495-0512*. Насколько эффективно, с учетом этого, использовать для оценки эпидемической опасности изолятов *V. cholerae* маркеры данного мобильного генетического элемента? Можно ли исключить дальнейшие преобразования структуры острова пандемичности с утратой используемого для детекции в настоящей работе гена (*vc0514*) или его полную элиминацию?

Высказанные вопросы и замечания не снижают общей ценности диссертационного исследования Агафоновой Е.Ю.

Заключение

Таким образом, диссертация Агафоновой Елены Юрьевны «Вариабельность генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор» является самостоятельной, завершённой научно-квалификационной работой, направленной на изучение фундаментальных вопросов генетического родства и эпидемической значимости разных групп штаммов холерного вибриона, а также разработку нового способа оценки эпидемической опасности возбудителя, перспективного для применения в рамках микробиологического мониторинга холеры. По актуальности проблемы, научной новизне, практической значимости, методическому уровню диссертация соответствует требованиям п. 9, 10, 11, 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Агафонова Елена Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент

Миронова Лилия Валерьевна
доктор медицинских наук
заведующая лабораторией холеры
Федерального казенного учреждения
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,
664047 г. Иркутск, Трилиссера, 78;
тел. 8(3952) 239985, 89149166564
e-mail: mironova-lv@yandex.ru

Подпись Мироновой Л.В. заверяю
ученый секретарь того же института



А.Г. Трухина