

## ОТЗЫВ

научного руководителя на диссертационную работу Агафоновой Елены Юрьевны “Вариабельность генома нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор”, представляемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Диссертационная работа Агафоновой Елены Юрьевны выполнена в лаборатории патогенных вибрионов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Исследования проводились в рамках плановых НИР 47-4-14 “Молекулярно-генетический анализ механизмов изменения патогенных и адаптивных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор в современный период 7-ой пандемии холеры” (№ гос. регистрации 012014557721) и 76-4-19 “Комплексный геномно - протеомный анализ вариабельности эпидемически значимых свойств *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Российской Федерации”.

Актуальность диссертационной работы, посвященной выявлению молекулярно-генетических особенностей нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, широко распространенных в водной среде и относящихся к разным генотипам ( $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ ,  $ctxA^-tcpA^+VSP^-$  и  $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ ), обусловлена отсутствием полных сведений о составе и структурных особенностях участков их генома, связанных с патогенностью, персистенностью и эпидемичностью, полученных на основе анализа их полных геномов. Такие сведения необходимы для лучшего понимания современных популяционных структур нетоксигенных штаммов, циркулирующих на территории РФ и сопредельных стран, что может быть использовано для разработки новых способов определения их происхождения и путей заноса. До сих пор остается не совсем ясной эпидемическая значимость штаммов  $ctxA^-tcpA^+$ , выявляемых в РФ. Более того, представлял несомненный интерес сравнительный анализ геномов нетоксигенных штаммов  $ctxA^-tcpA^+$  с эндемичных и неэндемичных по холере территорий с целью выяснения генетической основы потенциальной эпидемической опасности первых. Накопленная информация о структуре генома различных групп нетоксигенных штаммов может служить основой для решения таких прикладных задач, как разработка нового генодиагностического способа дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с разной эпидемической значимостью и конструирования авирулентных штаммов продуцентов протективных антигенов.

При решении поставленных задач было использовано 190 штаммов микроорганизмов. Из них 174 – *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, 6 – *V. cholerae* неO1/O139 серогруппы. Кроме того, исследовано 5 штаммов близкородственных видов рода *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. albensis*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) и 5 штаммов энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*). Применялись разнообразные традиционные микробиологические и современные молекулярно-генетические (ОТ-ПЦР, секвенирование, биоинформационный анализ) методы, адекватные поставленным задачам.

На первом этапе работы были проведены фундаментальные исследования, направленные на определение вариабельности генома нетоксигенных штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, изолированных на территории Российской Федерации и сопредельных эндемичных и неэндемичных по холере стран. С этой целью провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов 37 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в



неэндемичных (РФ, Украина, Грузия, Туркменистан) и эндемичных (страны Юго-Восточной Азии) по холере регионах. В результате было установлено, что нетоксигенные штаммы на неэндемичной по холере территории (изучено 29 штаммов) представлены двумя генетически различными группами  $ctxA^-tcpA^-VSP^-$  и  $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ , отличающимися друг от друга по составу мобильных элементов, определяющих их патогенный потенциал. Характерной особенностью штаммов первой группы ( $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ ) являлось отсутствие всех профагов вирулентности (CTXφ, RS1φ, TLCφ), острова патогенности VPI-1 и островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Впервые обнаружена нестабильность генома острова патогенности VPI-2, которая проявлялась в наличии делеций различной протяженности (от 33887-38081 п.н. до 47120-49986 п.н.) у всех исследованных штаммов. Получены новые данные о высоком уровне вариабельности 16 генов *msh* из острова персистенции EPI, участвующих в образовании биопленки. Количество однонуклеотидных замен в них достигало 54-252 в зависимости от штамма. Многочисленные несинонимичные и синонимичные замены (от 11 до 196) обнаружено также в генах коровой области *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, кодирующих дополнительные факторы патогенности. Полученные данные позволили на генетическом уровне подтвердить эпидемическую безопасность этих штаммов.

Геном второй группы вибрионов ( $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ ) отличался от первой наличием у всех изолятов острова патогенности VPI-1 с геном *tcpA<sup>ET</sup>*. Обнаружена также нестабильность VPI-2, которая, в отличие от вибрионов  $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ , выражалась в делеции участка ДНК протяженностью 33965-34352 п.н. лишь у 33,3% изученных штаммов. Однако в сохранившемся гене *nanH* этих штаммов выявили множество однонуклеотидных замен – 17-19 несинонимичных и 46-47 синонимичных. Вариабельность генов *msh* из EPI, а также генов *hlyA*, *hapA* и *rtxA* была относительно невелика (число однонуклеотидных замен в них составляло 0-43). Приоритетными являются данные об отсутствии островов пандемичности среди всех изученных штаммов  $ctxA^-tcpA^+$ , циркулирующих на территории РФ и в других неэндемичных по холере регионах. Полученные сведения приводят к заключению об отсутствии их потенциальной эпидемической опасности.

Что касается нетоксигенных штаммов с генотипом  $ctxA^-tcpA^+$  из эндемичных по холере территорий, то при анализе нуклеотидных последовательностей восьми (взяты из базы данных NCBI GenBank) изолятов установлено, что они относились к третьей группе и отличались от первых двух присутствием островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Более того, эти штаммы  $ctxA^-tcpA^+VSP^+$  по составу и структуре генома имели значительное сходство с токсигенными изолятами. Отсутствие только профага CTXφ при наличии в геноме всех других ключевых мобильных элементов с генами патогенности, эпидемичности и персистенции служит указанием на возможность их реверсии в токсигенные посредством фаговой конверсии, вследствие чего эти штаммы могут представлять потенциальную эпидемическую опасность.

Выявленные геномные различия между сравниваемыми генотипами нетоксигенных штаммов поставили вопрос об их филогенетических связях. В этой связи было проведено SNP-типирование 47 токсигенных и нетоксигенных штаммов. Оказалось, что нетоксигенные штаммы с генотипом  $ctxA^-tcpA^+VSP^+$  имеют общее происхождение с токсигенными, тогда как нетоксигенные штаммы  $ctxA^-tcpA^+VSP^-$  и  $ctxA^-tcpA^-VSP^-$  относятся к двум отдельным филогенетически обособленным группам.

В целом, полученные данные расширяют представление о геномном разнообразии нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулирующих на территории РФ, способствуют пониманию их филогенетической связи и открывают перспективы для выявления



закономерностей преобразований генома холерных вибрионов в процессе адаптации к существованию в водной среде.

Два последующих этапа работы связаны с решением прикладных задач на основе полученных фундаментальных данных. Один из итогов этой работы - разработка нового способа дифференциации нетоксигенных штаммов с разной эпидемической значимостью на основе метода ПЦР-ЭФ. В качестве ДНК-мишеней выбраны гены *ctxA* и *tcpA*, входящие в состав профага вирулентности СТХф и острова патогенности VPI-1 соответственно, а также гены *vc0180* и *vc0514*, локализованные на островах пандемичности VSP-I и VSP-II. Специфичность разработанного способа подтверждена использованием различных штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогруппы, близкородственных видов рода *Vibrio*, а также штаммов энтеробактерий в ПЦР-тестировании, а его эффективность доказана исследованием 167 штаммов *V. cholerae* O1. Подтверждает новизну данного способа полученный патент на изобретение (Патент №2671412 от 31.10.2018 г., бюл. №31). Этот способ может быть использован при проведении расширенного генодиагностического анализа штаммов *V. cholerae* O1, выделенных при мониторинговых исследованиях воды поверхностных водоемов, а также для паспортизации штаммов холерных вибрионов из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Кроме того, получение сведений о структуре генома нетоксигенных штаммов разных генотипов позволило впервые сконструировать на основе генетически измененного штамма авирулентный штамм *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с высоким уровнем продукции иммуногенной В-субъединицы СТ путем введения в его клетки клонированного гена *ctxB1* в составе рекомбинантной плазмиды. Показан высокий уровень стабильности наследования рекомбинантной плазмиды с геном *ctxB1* в клетках созданного штамма в отсутствие селективного давления (95%). Эффективная экспрессия и стабильность наследования клонированного гена *ctxB1* в клетках сконструированного штамма дает возможность использования его для получения В-субъединицы при изготовлении иммунобиологических препаратов. Кроме того в перспективе этот штамм *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор может быть использован для повышения эффективности вакцины холерной бивалентной химической, изготавливаемой в настоящее время на основе только штаммов холерных вибрионов классического биовара.

Практическая значимость работы включает депонирование в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» двух сконструированных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с измененной продукцией термолабильного гемолизина (KM2041) и иммуногенной В-субъединицей холерного токсина (KM2042). Полученные штаммы могут быть использованы для изготовления иммунобиологических препаратов. Кроме того, в международной базе данных NCBI GenBank депонированы 30 нуклеотидных последовательностей полных геномов нетоксигенных и 11 токсигенных штаммов холерного вибриона, выделенных на территории РФ, Украины, Туркменистана в разные временные периоды (1970-2017 гг.).

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

Сведения по молекулярно-генетической характеристике токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 могут быть использованы для пополнения паспортных данных Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Полученные данные



включены в курс лекций «Микробиология и генетика возбудителя холеры» на курсах профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

На основании изложенного выше считаю, что научная новизна и практическая значимость работы вполне очевидна. Основное содержание диссертации полностью отражено в автореферате и 13 научных работах, из которых 3 статьи опубликованы в периодических изданиях из Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России. Цель диссертации, поставленные задачи, положения, выносимые на защиту, и выводы связаны основной идейной линией и не противоречат друг другу. Все положения, выносимые на защиту, доказаны. Результаты исследования прошли широкую апробацию и представлялись как на российских, так и международных конференциях.

Считаю, что диссертационная работа Агафоновой Елены Юрьевны «Вариабельность генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную лично соискателем на современном методическом уровне, которая полностью соответствует требованиям «Положений о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ и может быть представлена к защите по специальности 03.02.03 – микробиология.

Научный руководитель

главный научный сотрудник ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора,  
доктор биологических наук, профессор

*Смирнов*

Н.И. Смирнова

Подпись Н.И. Смирновой заверяю

Начальник отдела кадров

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора



*Шумигай*

/О.В. Шумигай/

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46, тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12, e-mail: rusrapi@microbe.ru.