

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.078.02
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО КАЗЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 30 мая 2019 г. № 10

О присуждении Агафоновой Елене Юрьевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Вариабельность генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 15 марта 2019 г. (протокол заседания № 6) диссертационным советом Д 208.078.02, созданным на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «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.

Соискатель Агафонова Елена Юрьевна 1991 года рождения. В 2013 году соискатель окончила ФГБОУ ВО Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского Минобрнауки России. Работает в должности научного сотрудника в ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Диссертация выполнена в лаборатории патогенных вибрионов ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор Смирнова Нина Ивановна, ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, лаборатория патогенных вибрионов, главный

научный сотрудник.

Официальные оппоненты: Миронова Лилия Валерьевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией холеры ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; Ткаченко Галина Александровна, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Ведущая организация – ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, в своем положительном заключении, подписанном Монаховой Еленой Владимировной, доктором биологических наук, старшим научным сотрудником, ведущим научным сотрудником лаборатории микробиологии холеры, указала, что принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы нет. Однако хотелось бы услышать ответы на следующие вопросы: 1. Учитывая множественность путей эволюции холерных вибрионов, допускаете ли Вы существование «обратного» процесса, т.е. постепенного приобретения всех необходимых мобильных элементов авирулентными обитателями водоемов и не являются ли именно они предками возбудителей эпидемической холеры? 2. Существуют $ctx^-tcp^-VSP^+$ штаммы, выделенные от больных с диагнозом холера. Возбудители крупной вспышки в Судане - штаммы O37 серогруппы, имеют генотип $ctx^+tcp^+VSP^-$. Как следует интерпретировать такие результаты и к какой категории относить штаммы с «нестандартными» наборами генетических детерминант, предполагается ли в дальнейшем расширение схемы типирования за счет включения дополнительных мишеней? 3. Штаммы, лишенные гена tcp , потенциально могут приобрести профаг СТХ альтернативными путями. Если такое событие произойдет и образуются варианты CTX^+VPI^- , будет ли зависеть их патогенетический потенциал и способность к распространению от присутствия островов VSP ? В целом диссертация Агафоновой Елены Юрьевны является завершенной научно-квалификационной работой, в которой помимо получения ответов на ряд ранее не изученных вопросов решены важнейшие теоретические и научно-практические задачи. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему и методическому уровню

проведенных исследований, качеству изложения и репрезентативности фактического материала работа полностью соответствует требованиям п. 9, 10, 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 13 работ общим объемом 67 страниц, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 3 статьи, 1 в издании, индексируемом в Scopus, 1 патент РФ. Публикации отражают все разделы диссертации. Соискатель принимал непосредственное участие в подготовке всех работ, в 6 из них является первым автором. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Наиболее значительные публикации:

1. Смирнова Н.И. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью / Н.И. Смирнова, Т.А. Кульшань, Е.Ю. Баранихина*, Я.М. Краснов, Д.А. Агафонов, В.В. Кутырев // Генетика. – 2016. – 52(9). – С. 1029-1041. 2. Смирнова Н.И. Конструирование и изучение свойств авирулентного генетически измененного штамма *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с инактивированными генами термолабильного гемолизина и эффективной экспрессией клонированного гена В-субъединицы холерного токсина / Н.И. Смирнова, Е.Ю. Щелканова, Е.Ю. Баранихина*, Д.А. Агафонов, И.В. Тучков, Я.М. Краснов, В.В. Кутырев // Биотехнология. – 2017. – 33(1). – С. 30-41. 3. Смирнова Н.И. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран / Н.И. Смирнова, Е.Ю. Агафонова, Е.Ю. Щелканова, Д.А. Агафонов, Я.М. Краснов, Л.Ф. Ливанова, В.В. Кутырев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. – №2. – С. 76-86. (* - фамилия автора Баранихина Е.Ю. изменена на Агафонову Е.Ю.)

На диссертацию и автореферат дали положительные отзывы без замечаний:

1. Фрейлихман Ольга Александровна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярно-генетических технологий ФБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора. 2. Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биохимии и биофизики ФГБОУ ВО Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского Минобрнауки России. 3. Караваева Ольга Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБУН Институт

биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук. 4. Микеров Анатолий Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского Минздрава России. 5. Щербаков Анатолий Анисимович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова Минсельхоза России. 6. Василенко Надежда Филипповна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологии ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что Миронова Лилия Валерьевна является высококвалифицированным специалистом в области генетики возбудителя холеры, под ее руководством и при непосредственном участии проводятся исследования по совершенствованию методов диагностики и генотипирования возбудителя холеры, изучению молекулярно-биологических и эпидемиологических аспектов патогенности холерного вибриона; Ткаченко Галина Александровна имеет большой опыт работы в области молекулярно-генетических исследований на модели возбудителей особо опасных инфекционных болезней. Ведущая организация на основании приказа Роспотребнадзора является референс-центром по мониторингу за холерой на территории Российской Федерации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: разработана и реализована новая научная идея, позволяющая на основании анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор определять особенности их генотипов и эпидемическую значимость. Показано, что нетоксигенные штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^-VSP^-$, $ctxA^-tcpA^+VSP^-$, изолированные на неэндемичных по холере территориях, являются эпидемически безопасными. В то же время штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ из эндемичных по холере регионов могут представлять потенциальную эпидемическую опасность; доказано, что

нетоксигенные штаммы с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁺*, согласно данным SNP-типирования, относятся к филогенетической линии, включающей токсигенные эпидемически опасные штаммы. Нетоксигенные штаммы *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻* и *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻* принадлежат к двум отдельным филогенетически обособленным группам, удаленным как от токсигенных изолятов, так и друг от друга; предложен новый способ дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор на основе мультиплексной ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, позволяющий определять эпидемическую значимость нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор на основе выявления в их геноме ключевых генов патогенности и эпидемичности; сконструирован авирулентный штамм *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, продуцирующий иммуногенную В-субъединицу холерного токсина, который может быть использован при производстве холерной бивалентной химической вакцины.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: изложены положения, расширяющие знания о геномном разнообразии нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулирующих на территории эндемичных и неэндемичных по холере стран, включая Российскую Федерацию; изучена структура мобильных элементов с генами патогенности, пандемичности, персистенции, а также генов коровой области, кодирующих дополнительные факторы патогенности, у нетоксигенных штаммов, изолированных в неэндемичных и эндемичных по холере регионах и выявлены их новые отличия от таковых токсигенных эпидемически опасных штаммов; применительно к проблематике диссертации результативно использованы методы полногеномного секвенирования и SNP-анализа, позволившие определить филогенетические связи между различными группами нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: депонирована в международной базе данных NCBI GenBank 41 нуклеотидная последовательность полных геномов токсигенных и нетоксигенных штаммов холерного вибриона, выделенных на территории Российской Федерации, Украины и Туркменистана в 1970-2017 гг.; депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»

Роспотребнадзора сконструированные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с измененной продукцией термолабильного гемолизина (KM2041) и иммуногенной В-субъединицей холерного токсина (KM2042); разработаны методические рекомендации «Дифференциация нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор *ctxA⁻tcpA⁺* по их эпидемической значимости методом мультиплексной ПЦР», одобренные ученым советом и утвержденные директором института (протокол №4 от 24.11.2017 г.); материалы диссертации включены в лекции курсов профессиональной переподготовки «Бактериология. Основы безопасности работы с патогенными биологическими агентами I-II группы патогенности».

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что большой экспериментальный материал получен на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании, показана воспроизводимость результатов в повторяющихся экспериментах. В работе применялись современные микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические методы исследования и анализа данных. Использовалось высотехнологичное оборудование для полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами и зондами, полногеномного секвенирования по технологии ионного полупроводникового секвенирования. Нуклеотидные последовательности полных геномов анализировались с использованием информационных ресурсов международной базы данных NCBI GenBank и программных пакетов Lasergene DNASTAR SeqMan pro, BEAST 2.4.0., BioEdit, MEGA 7, Mauve v.2.4.0, Figtree v. 1.4.3.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном проведении сбора и анализа литературных данных по проблеме, участии в обсуждении цели и задач исследования, планировании экспериментов, получении и обработке экспериментальных данных. Подготовка основных публикаций осуществлена как лично автором, так и при его непосредственном участии.

На заседании 30 мая 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Агафоновой Е.Ю. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология

(биологические науки), участвовавших в заседании, из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета

Попов Юрий Алексеевич

Ученый секретарь
диссертационного совета
31 мая 2019 г.

Микшис Наталья Ивановна