

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию АРХАНГЕЛЬСКОЙ Ирины Викторовны «Характеристика *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области и Республике Калмыкия», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп (НАГ-вибрионы) широко распространены в природе и известны как возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) различной степени тяжести – от слабой и умеренной диареи до алгидных форм с летальным исходом (Finch et al., 1987; Dalsgaard et al., 1995; Singh et al., 2001; Bidinost et al., 2004; Luo et al. 2013 и др.). В России и бывших республиках СССР большинство вспышек, вызванных *V.cholerae* nonO1/nonO139, было зарегистрировано в прошлом столетии, затем число сообщений о них значительно снизилось (Онищенко с соавт., 2001). Тем не менее, они продолжают регистрироваться в виде спорадических случаев.

Родственные связи между возбудителями прежних вспышек и нынешних спорадических, в т.ч. множественных, случаев до сих пор изучены недостаточно; неясны и причины их столь длительной циркуляции в отдельных регионах. Возможными объяснениями подобной ситуации может быть длительное сохранение возбудителя в объектах внешней среды или в организме носителей. Однако существует вероятность периодического заноса НАГ вибрионов с других территорий.

Установление наиболее вероятного происхождения, источников и путей распространения инфекции, патогенетического и персистентного потенциала штаммов путем сравнения фенотипических и генотипических свойств культур, выделенных от больных и из объектов внешней среды на одной территории, является, несомненно, актуальной задачей.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Исследования Архангельской И.В. выполнены на современном научно-методическом уровне. Автором проанализирован большой объем литературных данных и убедительно обоснован выбор направления исследований. Четко сформулирована цель исследования. Задачи вытекают из поставленной цели работы, компактно и последовательно отражают решение поставленных в диссертации вопросов.

Экспериментальные исследования проведены с использованием комплекса методов молекулярной биологии, генетики, микробиологии, биохимии, биоинформатики. Исполь-

зовано аналитическое высокотехнологичное оборудование. Разнообразие использованных методов свидетельствует о высоком уровне профессиональной подготовки автора, обеспечившем получение и объективную оценку результатов экспериментов.

Семь основных выводов, приведенных в диссертации, обоснованы анализом достаточно большого объема достоверных экспериментальных данных. Положения, выносимые автором на защиту, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, аргументированы сравнением экспериментальных данных с результатами анализа литературы.

Научная новизна диссертационной работы.

Проведено комплексное изучение свойств 196 штаммов, в результате которого получены приоритетные данные о фено- и генотипическом разнообразии, а также устойчивости к антибиотикам НАГ-вибрионов, циркулирующих на территориях Ростовской области и Республики Калмыкия.

На основе данных ПЦР созданы индивидуальные генетические портреты штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139. Определены наборы генов факторов патогенности штаммов nonO1/nonO139 серогруппы, и генов факторов персистенции, обуславливающих выживание и длительное существование бактерий во внешней среде.

Секвенированы полные геномы 20 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, вызвавших острые кишечные инфекции в Ростовской области и Республике Калмыкия.

Идентифицированы отдельные гены, их кластеры, геномные острова, а также новые аллели наиболее значимых генов факторов патогенности и персистенции: *rtxA*, *nanH*, *mshA*, *chxA*, *cef*, *hapA*, *priV*. Проведен сравнительный биоинформационный анализ продуктов этих генов, что позволяет прогнозировать возможность экспрессии генов и продукции полноценных белков.

Идентифицированы ранее не описанные варианты цитотоксина RtxA; выявлены существенно отличные от прототипа варианты нейраминидазы; определена полная структура кластеров, ответственных за продукцию MSHA-подобных пилей адгезии; идентифицированы гены кластера системы секреции третьего и шестого типов.

Среди клинических штаммов, выделенных в Ростовской области, выявлены представители трех клональных комплексов, способные к длительному сохранению и распространению.

Перечисленные результаты, несомненно, можно считать приоритетными, что свидетельствует о безусловной новизне исследования.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования.

Полученная соискателем новая информация, несомненно, имеет перспективы для практического применения.

По результатам исследования разработана структура пополняемых баз данных «Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп, циркулирующие в Ростовской области» (Свидетельство о регистрации базы данных № 2015620331 от 19.02.2015) и «Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп Республики Калмыкия» (свидетельство № 2017620363 от 03.04.2017). Обе базы данных внедрены в Ростовском и Волгоградском НИПЧИ.

В Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» депонированы 7 штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139.

В NCBI GenBank депонированы 157 нуклеотидных последовательностей, в том числе полные геномы двух штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139.

Разработаны, одобрены Ученым советом (протокол №9 от 08.12.2015) и утверждены директором Ростовского противочумного института методические рекомендации по изучению чувствительности/устойчивости холерных вибрионов к *Dictyostelium discoideum*.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.

Работа выполнена автором в лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовского-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского противочумного института» Роспотребнадзора в рамках трех плановых тем НИР. Личный вклад автора состоит в анализе современной литературы по теме диссертации, обсуждении цели исследования, планировании наиболее эффективных путей для решения поставленных задач, выполнении экспериментальных работ, обсуждении и интерпретации полученных результатов. Депонирование штаммов, опубликование статей и тезисов докладов выполнено в соавторстве с другими сотрудниками Ростовского противочумного института.

Апробация работы, публикации.

Результаты диссертационного исследования Архангельской И.В. прошли серьезную апробацию. По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ, в том числе 4 статьи, опубликованных в журналах из перечня ВАК и индексируемых в Web of Science, Scopus. Материалы диссертации обсуждены на конференциях российского и международного рангов.

Общая характеристика содержания диссертации.

Диссертация построена по традиционному плану и оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к рукописям работ подобного ранга. Она состоит из введения, литературного обзора, главы «Материалы и методы», трех глав собственных исследований, заключения и выводов. Объем диссертации 171 страница машинописного текста. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 17 таблицами. Список литературы включает 259 публикации, в том числе 55 работ отечественных и 204 – иностранных авторов.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям текста диссертации.

Во введении обоснована актуальность выбранного направления, сформулированы цель и задачи исследования, новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** представлены данные отечественной и зарубежной литературы о роли *V.cholerae* nonO1/nonO139 в этиологии острых кишечных инфекций; возможных источниках и путях передачи болезни, данные о серогрупповой принадлежности штаммов НАГ-вибрионов, факторах патогенности и распространенности штаммов, резистентности к действию антибиотиков; рассмотрены гипотезы о происхождении НАГ-вибрионов. Обзор литературы написан в хорошем стиле и дает возможность составить достаточно полное представление о перспективности направления собственных исследований.

Глава 2 «Материалы и методы». Представлены сведения о многочисленных штаммах *V.cholerae* nonO1/nonO139, послуживших объектом исследований автора (196 клинических штаммов, выделенных в Ростовской области и Республике Калмыкия, и 60 штаммов, изолированных из объектов внешней среды на этих же территориях). В достаточном объеме отражены использованные как традиционные бактериологические, так и молекулярно-биологические методы (ПЦР, секвенирование, биоинформационный анализ) исследований.

Все исследования выполнены на современном оборудовании с использованием сертифицированных тест-систем.

Глава 3 посвящена изучению распространения, этиологической значимости и фенотипической характеристике холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп. Автор провела анализ заболеваемости острыми кишечными инфекциями на территории Ростовской области и Республики Калмыкия в период с 1968 по 2018 гг. По результатам анализа сделано заключение о том, что штаммы указанных микроорганизмов продолжают вызывать заболевания у людей на этих территориях. Для инфекций характерны: спорадическая заболеваемость, отсутствие вспышек, разрозненность очагов инфекции, возраст заболевших (до 14 лет). Проведены мониторинговые исследования проб воды и гидробионтов Таганрогского залива (2011-201 гг.) на наличие холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп. Исследовано 1223 пробы морской воды и выделено 890 штаммов НАГ вибрионов.

Для комплексного анализа использовано 196 клинических штаммов НАГ-вибрионов и 60 штаммов, изолированных из объектов окружающей среды. Культурально-морфологические свойства всех исследованных штаммов, их способность к гемолизу были типичными для холерных вибрионов.

Считаю важным отметить, что серотипирование проводили с помощью набора из 80 моноспецифичных сывороток, полученных автором. При серотипировании штаммов установлено, что 64,9% из них принадлежат к 42 серогруппам, причем представителей 15 серогрупп выделяли как на территории Ростовской области, так и в Республике Калмыкия. Полученные данные свидетельствуют в пользу циркуляции родственных штаммов в данном географическом регионе. Отмечены изменения серологического пейзажа среди клинических штаммов, изолированных в Ростовской области. В группе штаммов, выделенных после 2000 г., были выявлены представители пяти ранее не встречавшихся на данной территории серогрупп.

Анализ профилей устойчивости к антибактериальным препаратам выявил значительную вариабельность фенотипов исследованных штаммов. Отмечено увеличение в настоящее время числа антибиотико-резистентных культур, расширение спектра маркеров антибиотикорезистентности за счёт появления устойчивости к стрептомицину и фуразолидону, а также появление культур с множественной антибиотикорезистентностью.

В главе 4 представлены результаты ПЦР-генотипирования холерных вибрионов nonO1/nonO139 серогрупп.

Следует отметить впечатляющий объем проведенных исследований, результаты которых представлены в этой главе. Проведена ПЦР-детекция 34 генов факторов патогенности и персистенции у 256 клинических и водных штаммов. В результате установлена неоднородность популяций этих штаммов по наличию искомым генов. Все изученные штаммы были лишены гена холерного токсина, но содержали детерминанты таких факторов патогенности/персистенции как гемагглютинин/протеаза, металлопротеаза PrtV, коллагеназа VchC (VC1650), цитотонический фактор Cef, транслоконы систем секреции третьего и шестого типа (T3SS и T6SS), факторы жизнеобеспечения и персистенции OmpW (белок наружной мембраны), *tol*- и *vps*-кластеров, а также регуляторных генов *toxR* и *hapR*. У всех изученных штаммов отсутствовали гены профага RS1, регулятора ToxT (входящего в состав VPI), термостабильного, шигаподобного токсинов, прямого термостабильного и родственного ему гемолизинов. Остальные гены были выявлены в различных сочетаниях. Таким образом, с помощью ПЦР созданы индивидуальные генетические портреты штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Особый интерес представляет выявление у 22 клинических штаммов гена cholix-токсина (*chxA*) – блокатора белкового синтеза эукариот, который, по литературным данным, отвечает за развитие внекишечных форм болезней, вызванных вибрионами nonO1/nonO139 серогрупп, способствует колонизации водных ракообразных.

По результатам кластерного анализа данных ПЦР было выявлено 254 генотипа, которые сформировали 12 кластеров. Один из них (J) был представлен единственным клиническим штаммом, два других (K и L) включали по два штамма. Внутри остальных кластеров штаммы отличались друг от друга наличием/отсутствием одного или нескольких генов, при этом клинические штаммы оказались более разнообразными и вошли в состав всех кластеров. Шесть кластеров, наряду с клиническими, содержали штаммы из объектов окружающей среды, что свидетельствует о наличии между ними родственных связей.

Выявление конкретных наборов генов факторов патогенности/персистенции у *V.cholerae* nonO1/nonO139 различных серогрупп позволило создать индивидуальный «генетический» портрет каждого штамма и, с помощью кластерного анализа, объединить культуры со сходными генотипами в один кластер.

По результатам исследований показано, что острые кишечные инфекции способны вызывать штаммы вибрионов неO1/неO139 серогрупп с минимальным набором генов токсических субстанций, причем в роли основного фактора патогенности у различных штаммов могут выступать разные факторы (Т3SS, MARTX, гемолизин HlyA, сериновая протеаза, гемагглютинин/протеаза).

Глава 5 посвящена изучению структуры геномов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп. Автором было осуществлено полногеномное секвенирование 20 клинических штаммов *V.cholerae* nonO1/nonO139. Анализ полученных результатов по наличию и количеству точечных мутаций в 1747 генах выявил большое количество однонуклеотидных замен (SNP).

По результатам кластерного анализа данных ПЦР и SNP-анализа часть штаммов группировалась одинаково на обеих дендрограммах. Они сформировали три клональных комплекса клинических штаммов, изолированных в Ростовской области, которые способны к длительному сохранению и распространению. ПЦР- и SNP-генотипы остальных штаммов не коррелировали друг с другом.

Дальнейший анализ полногеномных последовательностей штаммов НАГ-вибрионов был направлен на выявление и изучение структуры наиболее значимых генов и их кластеров – RTX, *chxA*, VC1649, *vchC* (VC1650), *cef*, *hlyA*, *hapA*, *nanH*, *ompU*, *ompW*, *msh*, *toxR*, *hapR*, Т3SS, Т6SS, Идентифицированы геномные острова, кластеры генов, а также новые аллели генов *rtxA*, *nanH*, *mshA*, *chxA*, *cef*, *hapA*, *prtV*.

Был проведен биоинформационный анализ продуктов наиболее значимых генов факторов патогенности и персистенции в целях прогнозирования возможности экспрессии генов и продукции кодируемых ими белков.

В исследуемой группе штаммов ген *rtxA* был представлен множеством аллелей, значительно отличающихся от прототипа (*rtxA* референс-штамма *V.cholerae* N16961), и их продукты также различались по аминокислотному составу. Впервые были выявлены варианты цитотоксина RtxA, которые лишены ключевого актин-связывающего домена, но образующие новые домены, обуславливающие у других возбудителей адгезивные и токсические функции. При анализе генов четырех наиболее значимых протеаз (сериновая протеаза, коллазеназа, металлопротеаза PrtV, гемагглютинин/протеаза) было выявлено различное количество гомологов этих генов (от 16 до 20), которые содержали как единичные нуклеотидные замены, так и делеции/вставки. Несмотря на то, что детерминируемые ими ферменты в ряде случаев имели укороченную аминокислотную последовательность, все они сохраняли свою активность.

По результатам ПЦР и полногеномного секвенирования у семи изученных штаммов отсутствовал ген *nanH*, детерминирующий синтез нейраминидазы, являющейся важным фактором патогенности. В геномах трех штаммов этот ген находился в измененном состоянии, однако содержащие его штаммы обладали нейраминидазной активностью.

Отмечена значительная вариабельность генов *cef* НАГ-вибрионов и их продуктов. Среди них выявлены уникальные варианты. Однако, несмотря на значительную вариабельность аминокислотных последовательностей, все белки Cef сохранили активные домены.

Ведущая роль в адгезии НАГ-вибрионов принадлежит маннозочувствительным пиллям (MSHA), которые являются также фактором персистенции. Установлена полная нуклеотидная последовательность кластеров генов биосинтеза пилей MSHA. Показано, что штаммы с измененной структурой *msh* генов обладали способностью к гемагглютинации, причем реакция не ингибировалась маннозой.

При анализе регуляторного гена *toxR* были выявлены штаммы, содержащие усеченные гены с образования преждевременного стоп-кодона, однако их продукты содержали активные домены. Присутствие различных SNP в составе гена *hapR* приводило к возникновению «молчащих» мутаций.

У штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 идентифицированы гены кластера системы секреции третьего типа T3SS. Несмотря на выявленную вариабельность этих генов, штаммы сохраняли способность к экспрессии T3SS. Установлено, что не все штаммы содержали гены системы секреции 6 типа. Впервые были обнаружены штаммы «дикого» типа, утратившие гены эффекторов T6SS и биологическую активность по отношению к эукариотическим клеткам. Штаммы, содержащие интактные гены T6SS, экспрессировали ее антагонистическую активность по отношению к *Dictyostelium discoideum*.

Было установлено, что генетическое разнообразие популяции выражается не только в наличии/отсутствии определенных генов факторов патогенности и персистенции, но и различиями в составе их аллелей, продукты которых могут либо утрачивать функциональность, либо, наоборот, приобретать повышенную активность.

В заключение диссертационной работы соискатель суммировала обсуждавшиеся выше основные результаты масштабных экспериментальных исследований и наметила перспективы дальнейшей работы.

Отмечая достоинства рецензируемой работы, все же необходимо отметить, что при ее прочтении возникли некоторые замечания.

По всему тексту используют термин «республика Калмыкия». Слово Республика надо – с заглавной буквы.

Ссылки на литературные источники удобнее размещать в конце предложения, а то текст разбивается и его труднее читать (примеры в разделах «Актуальность», «Обзор литературы» и ряде других мест).

В главе 2 отсутствует раздел о методах статистической обработки результатов, хотя о ее проведении есть указания в разделах 2.5 и 2.9.

В тексте на стр. 84 представлен рисунок 6 – распределение кластеров в зависимости от источника выделения. В подписи к рисунку 6 и в тексте диссертации отсутствует описание (разбор, пояснения) к этому рисунку, что усложняет его анализ.

Есть замечания редакционного плана. В тексте нередко пропущены знаки препинания, использованы неверные падежные окончания (с. 26 – «...все штаммы, выделенных от больных...»; с. 54 – «...результаты исследований, проведенные нами...»).

Встречаются фрагменты текста, где не удалены результаты редакторской правки (с. 33 – «...другой второй не типировался»; с.47 – «... профаги всех профагов»; с. 83 «... которыми они обмениваются ими между собой» и еще на некоторых страницах).

По тексту диссертации имеются неудачные выражения (с. 22 – «в публикациях присутствуют штаммы...»).

При прочтении диссертации возник ряд вопросов, на которые хотелось бы получить ответы в процессе защиты.

1. Чем вызван Ваш интерес к штаммам НАГ-вибрионов именно Ростовской области и Республики Калмыкия? Представляют ли они уникальные популяции, отличающиеся строением генома от клинических штаммов из других регионов России и мира?

2. С чем, по вашему мнению, связано постоянное выявление больных ОКИ, вызванных НАГ-вибрионами, в Ростовской области и Калмыкии и довольно редкое – в других регионах России? Это результат действительного существования на указанных терри-

ториях особых условий для их циркуляции или недостатков клинической лабораторной диагностики?

3. Учитывая современную повышенную миграцию населения, как Вы оцениваете риск возникновения новых клонов возбудителя за счет генетического обмена в случаях заносов с других территорий штаммов, содержащих иные гены либо их аллели? Известны ли Вам случаи таких заносов в последние годы?

Следует подчеркнуть, что отмеченные недостатки не снижают достоинство работы и не влияют на ее общую положительную оценку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа АРХАНГЕЛЬСКОЙ Ирины Викторовны «Характеристика *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области и Республике Калмыкия» является завершенной научно-квалификационной работой, направленной на усовершенствование лабораторной диагностики холерных вибрионов. Работа соответствует специальности 03.02.03 – микробиология, что обосновано целью, задачами, методологией исследований, полученными результатами, положениями, вынесенными на защиту и выводами. Выполненная работа по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, связи исследований с научными темами, полноте публикаций в рецензируемых журналах полностью соответствует требованиям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:
Старший научный сотрудник
Федерального казенного учреждения здравоохранения
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
кандидат биологических наук
410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46
Тел: (8452) 26-21-31
Эл. почта: rusrapi@microbe.ru
www.microbe.ru


Куклева Л. М.