

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Крицкого Андрея Александровича «Фенотипический и молекулярно-генетический анализ диагностических и адаптационных свойств генетически измененных штаммов *VIBRIO CHOLERAE* O1 биовара *EL TOR*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Диссертационная работа А.А. Крицкого чрезвычайно актуальна, так как посвящена изучению возбудителя холеры — острого инфекционного заболевания, относящегося к особо опасным инфекциям, которое характеризуется пандемическим распространением и высокой летальностью при недоступности эффективного лечения.

В настоящее время известно, что в ходе развития последней пандемии возбудитель холеры Эль Тор претерпевал генетические изменения, важнейшими из которых являются появление новых «генетических» вариантов с повышенной вирулентностью, обусловленной появлением различных мутаций в ключевых генах патогенности и пандемичности. Глобальное распространение генетически измененных штаммов в эндемичных по холере странах и их периодический занос на территорию Российской Федерации требует разработки простых надежных методов детекции и дифференциации геновариантов возбудителя, что имеет большое значение для оптимизации микробиологического мониторинга холерных вибрионов.

В работе А.А. Крицкий, гармонизируя классический бактериологический метод ферментативной активности возбудителя холеры Эль Тор (реакция Фогес Проскауэра) и молекулярно-генетический, провел сравнительный анализ нуклеотидной последовательности структурных и регуляторных генов, кодирующих и контролирующих особенности ферментации глюкозы (биосинтез ацетоина), у «типичных» и «генетически» измененных штаммов возбудителя холеры Эль Тор.

Диссертантом создан диагностический набор олигонуклеотидных праймеров, зондов и штаммов, который позволил провести оценку экспрессии структурных и регуляторных генов в клетках холерных вибрионов (*V. cholerae* серогруппы O1 биовара El Tor) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В результате сравнительного изучения штаммов диссертантом показано, что диагностически значимым признаком для дифференциации биоваров *V. cholerae* O1 и детекции «генетически» измененных штаммов, может служить реакция Фогес–Проскауэра: так как в отличие от «типичных» штаммов, у 72,2% исследованных «геновариантов» возбудителя холеры, реакция Фогес–Проскауэра была слабоположительной, у 27,8% – отрицательной. Измененная

способность к образованию ацетоина у «геновариантов» является следствием делеции единичного нуклеотида в структурном гене, кодирующем фермент ацетолактат декарбоксилазу, а также высокий уровень экспрессии гена *aphA*, превышающий в 2,5 раза в сравнении с «типичными» штаммами.

Далее в процессе исследования была выявлена зависимость ростовых свойств «генетически» измененных штаммов от содержания глюкозы при культивировании их на средах в условиях дефицита питательных веществ. В отличие от «типичных» штаммов добавление в среды глюкозы оказывает ингибирующее влияние на их рост.

В модельных экспериментах установлено, что при совместном культивировании «типичных» и «генетически» измененных штаммов холерного вибриона в речной воде, выживаемость «генетически» измененных штаммов выше.

Полученные результаты работы позволили диссертанту сделать вывод о том, что современные «геноварианты» возбудителя холеры Эль Тор характеризуются более высоким уровнем адаптации к действию неблагоприятных факторов окружающей среды (дефициту питательных веществ) по сравнению с «типичными» штаммами.

Адаптационные преимущества «генетически» измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor по сравнению с «типичными» штаммами обусловлены повышенной скоростью роста бактериальной популяции, а также увеличенной экспрессией глобального регулятора стрессового ответа гена *rpoS*.

В результате проведенной работы А.А. Крицким получены новые фундаментальные знания, которые расширяют представления об изменении структуры и функции возбудителя холеры Эль Тор в процессе эволюции и создают основу для разработки новых диагностических возможностей дифференциации «типичных» и «генетически» измененных штаммов при проведении микробиологических мониторинговых исследований в системе эпидемиологического надзора холеры, а также для разработки прогнозов развития глобальной ситуации по холере.

Диссертантом депонированы:

- в международную базу данных NCBI GenBank нуклеотидные последовательности полных геномов трех штаммов *V. cholerae* серогруппы O1 с разной структурой генов *als* оперона (коды доступа JFGR00000000, LAED00000000, LAEM00000000).

- в Государственную коллекцию патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» авторская коллекция из 10 сконструированных штаммов *E. coli* TOP10 (pCR 2.1) с клонированными участками структурных, регуляторных и видоспецифичных генов возбудителя холеры. Штаммы предназначены для использования в качестве стандартов при оценке экспрессии генов *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

(справки о депонировании штаммов КМ2031, КМ2032, КМ2033, КМ2034, КМ2035, КМ2036, КМ2037, КМ2038, КМ2039, КМ2040).

Работа А.А. Крицкого выполнена на современном методическом уровне, обладает несомненной научной новизной и практической значимостью. Результаты диссертации отражены в 8 работах, из которых 3 статьи в рекомендованных ВАК изданиях.

Принципиальных вопросов и замечаний к выполненной работе не имеется.

Заключение

Диссертация Крицкого Андрея Александровича «ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1 БИОВАРА EL TOR» по актуальности темы, объему исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости результатов отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - Микробиология.

Зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН «Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», доктор медицинских наук, профессор кафедры медицинской микробиологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова,

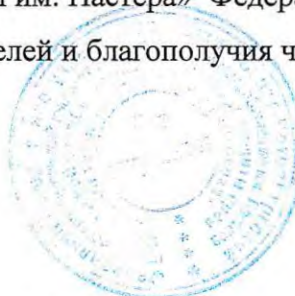
Кафтырева Лидия Алексеевна

01 марта 2019 г.

197101, Санкт-Петербург, улица Мира, 14; (812) 232-48-83; e-mail: kaflidia@mail.ru

«Подпись Л.А.Кафтыревой заверяю»

Ученый секретарь ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.м.н.



Трифонова Г.Ф.