

## ОТЗЫВ

научного руководителя по диссертационной работе Крицкого Андрея Александровича «Фенотипический и молекулярно-генетический анализ диагностических и адаптационных свойств генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара El Tor», представляемой на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Диссертационная работа Крицкого Андрея Александровича 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 в рамках плановой 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).

Актуальность диссертационной работы, посвященной выявлению фенотипических и молекулярно-генетических особенностей генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor, влияющих на проявление их диагностически значимых и адаптационных свойств, обусловлена тем, что в настоящее время данные штаммы получили широкое распространение в мире, заменив на эндемичной территории типичные изоляты, вызвавшие начало текущей пандемии. Периодически данные штаммы завозятся и в Российскую Федерацию, вызывая как единичные случаи, так и вспышки холеры. При фенотипическом анализе геновариантов выявлена вариабельность некоторых диагностически значимых признаков (устойчивости к полимиксину В, реакции Фогес-Проскауэра) генетические механизмы изменения которых до сих пор не установлены. Кроме того, не в полной мере исследованы адаптационные особенности генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, определившие вытеснение ими типичных штаммов.

В диссертационной работе было использовано 48 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы классического и El Tor биоваров. Применялись как классические микробиологические, так и современные молекулярно-генетические (ОТ-ПЦР, секвенирование) и биоинформационные методы исследования.

Для сравнительного анализа экспрессии регуляторных генов *alsR*, *aphA*, *hapR* и *rpoS*, контролирующих биосинтез белков, связанных с проявлением диагностически значимых и адаптационных свойств типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, использовали метод ОТ-ПЦР с гибридационно – флуоресцентным учетом результатов в

режиме реального времени. В связи с этим, на первом этапе работы был создан набор олигонуклеотидных праймеров, зондов, а также конструированы штаммы *E. coli* Top10, содержащие плазмиду с pCR 2.1. с клонированными участками указанных генов холерного вибриона, необходимых для определения их уровня относительной экспрессии в штаммах *V. cholerae* методом двухстадийной ОТ–ПЦР с гибридизационно – флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

Далее был проведен анализ способности генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в период с 1993 по 2014 гг. и имеющих разную структуру генов патогенности, пандемичности и адаптации, образовывать ацетоин из глюкозы в реакции Фогес–Проскауэра и выяснение генетических основ изменения его продукции. В результате установлено, что анализируемые штаммы давали либо отрицательную (27,8 %), либо слабоположительную (72,2 %) реакцию Фогес–Проскауэра. Исследование экспрессии регуляторных генов, контролирующих биосинтез ацетона, а также анализ нуклеотидной последовательности генов *als* оперона, кодирующих его продукцию, выявило, что слабоположительная (или отрицательная) реакция Фогес – Проскауэра у геновариантов (т.е. сниженная способность или отсутствие биосинтеза ацетона из глюкозы) обусловлена однонуклеотидной делецией в гене *alsD*, кодирующем ацетолактат декарбоксилазу, ответственную за декарбоксилирование ацетолактата в ацетон, а также повышенной экспрессией регуляторного гена *aphA*, участвующего в негативной регуляции биосинтеза ацетона.

Учитывая полученные данные, об измененной способности генетически измененных штаммов ферментировать глюкозу до ацетона в реакции Фогес-Проскауэра, далее был изучен их рост на питательных средах, содержащих разное количество данного углевода. В результате выявлено, что в условиях дефицита питательных веществ повышение концентрации глюкозы (выше 0,5 %) оказывает ингибирующее влияние на рост генетически измененных штаммов. В то же время в богатых питательными веществами средах такого эффекта не наблюдалось. На основании полученных данных было сделано заключение, что у геновариантов произошло изменение процессов метаболизма, в том числе ферментации глюкозы. Учитывая, присутствие данного углевода в значительном количестве в кишечнике человека, изменение утилизации глюкозы могло способствовать повышению адаптивных свойств данных штаммов при попадании в макроорганизм. Однако для установления механизма изменения ферментации глюкозы указанными штаммами и влияние данного процесса на их адаптационные свойства необходимы дополнительные исследования.

Следующий этап работы посвящен изучению второго важного вопроса, связанного с выявлением адаптационных особенностей геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor и проведено изучение их выживаемости при совместном нахождении с типичными изолятами в условиях дефицита питательных веществ. В результате установлено, что геноварианты обладают адаптационными преимуществами и доминируют над типичными штаммами. Важным результатом диссертационного исследования является выяснение причин конкурентного превосходства генетически измененных штаммов над типичными изолятами обусловленные повышенной скоростью роста бактериальной популяции, а также увеличенным уровнем экспрессии глобального гена-регулятора стрессового ответа *rpoS*. На основе полученных данных можно высказать предположение, что геноварианты будут устойчивы и к действию других неблагоприятных факторов внешней среды.

Практическая значимость работы включает депонирование в международной базе данных NCBI GenBank нуклеотидных последовательностей полных геномов трех штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы с разной структурой генов *als* оперона. В Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» депонирована авторская коллекция из 10 штаммов *E. coli* TOP10 pCR2.1 с клонированными участками структурных, регуляторных и видоспецифичных генов возбудителя холеры, используемых в качестве стандартов при оценке экспрессии генов *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Разработаны и одобрены Ученым советом (протокол №6 от 08.12.2015 г.) методические рекомендации «Алгоритм определения уровня экспрессии генов вирулентности *Vibrio cholerae* методом двухстадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени». Полученные новые данные о повышенных адаптационных особенностях штаммов геновариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor включены в курс лекций «Микробиология и генетика возбудителя холеры» на курсах профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

На основании вышеизложенного считаю, что научная новизна и практическая значимость работы вполне очевидна. Основное содержание диссертации полностью отражено в автореферате и 8 публикациях, из которых 3 статьи опубликованы в периодических изданиях из Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России. Все положения, выносимые на защиту, доказаны. Результаты исследования прошли широкую апробацию и представлялись как на российских, так и международных конференциях.

Андрей Александрович способен самостоятельно на высоком уровне проводить научные исследования. Его отличает стремление к постоянному совершенствованию имеющихся навыков работы, ответственное отношение к любому порученному делу, трудолюбие.

Считаю, что диссертационная работа Крицкого Андрея Александровича «Фенотипический и молекулярно-генетический анализ диагностических и адаптационных свойств генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара El Tor» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную лично соискателем на современном методическом уровне, которое 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,  
ведущий научный сотрудник отдела микробиологии  
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора,  
доктор биологических наук

 /С.П. Заднова/

Подпись С.П. Задновой заверяю  
Начальник отдела кадров  
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора



 /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: gusrapi@microbe.ru.