ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело №_____

Решение диссертационного совета от 03.02.2023 г. № 1

о присуждении Гончаровой Юлии Олеговне, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Аллельный полиморфизм факторов патогенности сибиреязвенного микроба» по специальности 1.5.11. – Микробиология принята к защите 15.11.2022 г. (протокол заседания № 29) диссертационным советом 64.1.002.01, созданным на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Гончарова Юлия Олеговна, 1993 г. рождения, в 2017 году окончила Биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова». В 2021 г. окончила аспирантуру в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, работает младшим научным сотрудником лаборатории микробиологии сибирской язвы в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и

биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории микробиологии сибирской язвы Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат биологических наук (1.5.11. Микробиология, 1.5.6. Биотехнология) Тимофеев Виталий Сергеевич, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория микробиологии сибирской язвы, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Еременко Евгений Иванович, доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория сибирской язвы, главный научный сотрудник,

Солонин Александр Сергеевич, доктор биологических наук (1.5.3. Молекулярная биология), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория молекулярной микробиологии, заведующий лабораторией,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-

исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Иркутск, в своем положительном отзыве, подписанном Мироновой Лилией Валерьевной, доктором медицинских наук, заместителем директора по научной и лабораторно-диагностической работе, и Кравец Еленой Владимировной, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником отдела эпидемиологии, указала, что диссертационная работа Гончаровой Юлии Олеговны на тему «Аллельный полиморфизм факторов патогенности сибиреязвенного микроба», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с изучением аллельного полиморфизма генов факторов патогенности *Bacilus anthracis* и корреляции результатов типирования с другими генетическими и фенотипическими признаками, что важно для современной микробиологии. По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Гончарова Юлия Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Соискатель имеет **14** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **12** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **4** работы, **2** работы в других изданиях и **6** тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций. Общий

объем работ – 121 п. л. Недостоверных сведений в опубликованных работах не содержится. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Гончарова, Ю.О.** Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных на территории России и сопредельных государств / **Ю.О. Гончарова**, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, А.Г. Богун, К.В. Хлопова, В.С. Тимофеев // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2021. – № 1. – С. 95-102. (SCOPUS SJR = 0.216).

2. Тимофеев, В.С. Пути распространения сибирской язвы в природных экосистемах / В.С. Тимофеев, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, **Ю.О. Гончарова**, И.А. Дятлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2021.- № 3. – С. 23-32. (SCOPUS, SJR = 0.216).

3. **Goncharova, Y.** Sequence variability of pXO1-located pathogenicity genes of *Bacillus anthracis* natural strains of different geographic origin / **Y. Goncharova**, I. Bahtejeva, G. Titareva, T. Kravchenko, A. Lev, I. Dyatlov, V. Timofeev // Pathogens. – 2021. – Vol.10, N12. – P.1556. (WoS, IF = 4.531), цит.: 2.

4. **Гончарова, Ю.О.** Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности возбудителя сибирской язвы как метод оценки микробиологических рисков при изменении климата / **Ю.О. Гончарова**, А.Г. Богун, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Р.И. Миронова, Т.Б. Кравченко, Н.А. Остарков, А.В. Брушков, В.С. Тимофеев, С.Г. Игнатов // Прикл. Биохим. Микробиол. – 2022. – Т.58. – № 4. – С. 1–13. (WoS, IF = 1.065).

На диссертацию и автореферат поступило **5** положительных отзывов от: **(1)** д-ра биол. наук **Захарчука Леонида Михайловича**, доцента кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва – без замечаний; **(2)** канд. биол. наук **Бабыкина Михаила Михайловича**, доцента Международного учебно-научного биотехнологического центра Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, содержит замечания: «довольно сложное в ряде случаев изложение анализа полученных данных; невысокое разрешение отдельных рисунков»; **(3)** канд. биол. наук **Фоменко Олега Юрьевича**, старшего научного сотрудника Центральной лаборатории микробиологии Всероссийского научно-исследовательского института

молочной промышленности, г. Москва, содержит вопросы и замечания: «Каким образом автору удалось провести полногеномное секвенирование изученных штаммов на приборе для полупроводникового секвенирования Ion Torrent PGM с использованием библиотек ДНК, подготовленных с использованием набора реагентов Nextera DNA Library Preparation Kit? Какое число штаммов *B. anthracis* было подвергнуто MVLST-генотипированию? На стр. 5 автор указывает, что в работе было использовано 60 штаммов из коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ, а на странице 10 - 98 штаммов. Вероятно, были использованы последовательности, ранее депонированные в GenBank, а не секвенированные *de novo*? К сожалению, из раздела «Материалы и методы» не совсем ясно, какие именно статистики были использованы диссертантом при определении достоверности различий кривых выживаемости при заражении модельных животных различными штаммами *B. anthracis*; в дальнейших работах диссертанта хотелось бы увидеть карту с исторической ретроспективой распространения штаммов *B. anthracis*, сопряженного с миграцией человеческих популяций по территории Евразии»; **(4)** канд. биол. наук **Филиппович Светланы Юрьевны**, старшего научного сотрудника лаборатории экологической и эволюционной биохимии Института биохимии им. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва – без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук, профессор Еременко Евгений Иванович является признанным специалистом в области изучения филогенетики возбудителя сибирской язвы, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гончаровой Ю.О. (**Mol. Phylogenet. Evol. – 2021**. – Vol. 159. – P. 107116; **Infect. Genet. Evol. – 2021**. – Vol. 92 – P. 104890; **Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2021.** – №1. – С. 81–86; **2020**. – №1. – С. 57–61; **2019**. – №1. – С. 98–102; **2019**. – №3. – С. 43-50; **2018**. – №1. – С. 63-65; **Астрахан. Мед. Журн. – 2020**. – Т.15, №2. – С. 13–23; **Russ. J. Genet. – 2019**. – Vol. 55. – P. 35–44; **BMC Genomics. – 2019**. – Vol. 20, №1. – P. 692; **Вестн. Рос. Военно-Мед. Акад. – 2018**. – Т. 20, №3. – С. 144–147; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2018**. – №6. – С. 37–43);

доктор биологических наук Солонин Александр Сергеевич является признанным специалистом в области молекулярной биологии бактерий рода *Bacillus*, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гончаровой Ю.О. (**Int. J. Biol. Macromol.** – **2022**. – Vol. 200. – P. 416-427; **Russ. J. Genet.** – **2021**. – Vol. 57, N 6. – P. 662–668; **Protein Expr. Purif. – 2021.** – Vol. 183. – P. 105864; **Russ. J. Bioorg. Chem.** – **2020**. – Vol. 46, N3. – P. 321–326; **2020**. – Vol. 46, N 6. – P. 1214–1220; **Toxins.** – **2020**. – Vol. 12, N 12. – P. 806; **Техн. Жив. Сист.** – **2020**. – Т. 17, № 4. – С. 18–30; **2018**. – Т. 15, № 3. – С. 21 – 26; **Биофизика** – **2020**. – Т. 65, № 6. – С. 1051 – 1057; **Heliyon**. – **2019**. – Vol. 5, N 6. – e01846).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения природно-очаговых инфекций, разработки специфических средств их профилактики, диагностики и лечения, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Гончаровой Ю.О. (**Пробл. Особо Опасн. Инф.** – **2022**. – № 1. – С. 122 – 129; **2022.** – № 1. – С. 24 – 34; **2021**. – № 3. – С. 51 – 59; **2021**. – № 4. – С. 67 – 78; **2018**. – №3. – С. 54 – 59; **Mol. Phylogenet. Evol.** – **2021**. – Vol. 159. – P. 107116; **Анал. Риск. Здор.** – **2021**. – № 2. – С. 94 – 104; **Acta Biomed. Scient.** – **2021**. – Т. 6, № 1. – С. 48 – 54; **2020.** – Т. 5, № 1. – С. 65 – 71; **2020**. – Т. 5, № 1. – С. 72 – 77; **Rus. J. Genet.** – **2020**. – Vol. 56, N 7. – P. 802 – 809; **BMC Genomics.** – **2019**. – Vol. 20, N. 1 – P. 692), а также наличием ученых, являющихся авторитетными специалистами по теме диссертации Гончаровой Ю.О.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработана схема MVLST-генотипирования сибиреязвенного микроба, имеющая высокую разрешающую способность, применимая для описания филогенетический структуры популяции вида *B. anthracis* и основанная на сравнении нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих факторы патогенности *B. anthracis*, расположенных на плазмиде pXO1 (*pagA*, *lef*, *cya* и *atxA*) и плазмиде pXO2 (*capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*, *acpA* и *acpB*);

предложен подход комбинированного использования canSNP- и предложенной в работе схемы MVLST-генотипирования, что позволяет

выявить генетические маркеры, указывающие на вероятное географическое происхождение штамма *B. anthracis*;

доказано, что $MVLST_{pXO1}$-профиль штамма *B. anthracis* коррелирует с его принадлежностью к эволюционной линии и canSNP-группе, а $MVLST_{pXO2}$-профиль - только с принадлежностью к эволюционной линии; ареал распространения превалирующей на территории бывшего СССР подгруппы A.Br.008/011 *pagA* 981A→T *B. anthracis* подтверждает гипотезу об антропогенном переносе *B. anthracis* через Евразию при монгольских завоеваниях в XIII-XVII вв.; CanSNP-группа *B. anthracis* A.Br.Aust94 на территории Кавказа представлена тремя субпопуляциями, одна из которых обладает маркером *capC* 351A→G, а другая – маркером *cya* 2178C→T, характерным для canSNP-подгруппы Kafkas-Geo 2; одна из подгрупп canSNP-группы *B. anthracis* A.Br.001/002 является переходным звеном к canSNP-группе A.Br.Ames; штаммы *B. anthracis* canSNP-группы B.Br.001/002, выделенные в Русской Арктике, близкородственны по MVLST-типу Центрально-Европейским изолятам группы B.Br.CNEVA; последовательности генов токсинообразования вакцинных бескапсульных штаммов *B. anthracis* A16R, Sterne, V770-NP-1R и STI-1 не имеют особенностей, отличающих их от вирулентных штаммов; штаммы *B. anthracis* разных $MVLST_{pXO1}$-генотипов статистически достоверно отличаются по вирулентности для мышей и морских свинок;

введены наименования схем генотипирования «$MVLST_{pXO1}$» и «$MVLST_{pXO2}$», обозначающие мультилокусное сиквенс-типирование генов вирулентности возбудителя сибирской язвы (Multi Virulence Locus Sequence Typing), расположенных на плазмидах *B. anthracis* pXO1 и pXO2, соответственно, а также термины «$MVLST_{pXO1}$-генотип» и «$MVLST_{pXO2}$-генотип», обозначающие принадлежность штамма *B. anthracis* к одной из филогенетических групп, на основе гомологии нуклеотидных последовательностей генов факторов патогенности возбудителя сибирской язвы, расположенных на плазмидах pXO1 или pXO2 соответственно.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что на севере России циркулируют штаммы *B. anthracis*, формирующие в рамках филогенетической группы B.Br.001/002 архаичную

подгруппу, эволюционно тесно связанную со штаммами группы B.Br.CNEVA, эндемичной для Центральной Европы, а также то, что результаты MVLST-генотипирования подтверждают гипотезу об антропогенном распространении *B. anthracis* через Евразию при монгольских завоеваниях в XIII-XVII вв.;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (получение единичных колоний культур штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* на плотной питательной среде, световая микроскопия, получение споровых культур микроорганизмов), биологических (анимализация на мышиной модели, оценка вирулентности штаммов на моделях мышей и морских свинок, иммунизация на модели морских свинок), молекулярно-биологических (выделение ДНК, полногеномное секвенирование, полимеразная цепная реакция, горизонтальный гель-электрофорез, подходы MVLST-, MLST-, canSNP- и MLVA-генотипирования), биоинформационных (сборка нуклеотидных последовательностей *in silico* по результатам полногеномного секвенирования, трансляция *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные, филогенетический анализ и построение филогенетических деревьев) и статистических (определение уровня значимости *p* и индекса биоразнообразия Симпсона);

изложена идея применения разработанного подхода MVLST-типирования для штаммов возбудителя сибирской язвы при изучении филогенетической структуры вида *B. anthracis*, а также суть предложенного в работе порядка подтверждения видовой принадлежности штамма *B. anthracis*, определения его плазмидного профиля, проведения canSNP- и MLVA7-типирования, что позволяет получить полноценную генетическую характеристику штамма и наиболее точно определить его относительное филогенетическое положение;

раскрыты дополнительные возможности применения метода MLST-типирования для определения эволюционной линии представителей вида *B. anthracis* и его дифференцирования от других видов бацилл;

изучен аллельный полиморфизм факторов патогенности представительной выборки штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных

на территории России и СССР, а также выборки штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank. Изучена филогенетическая структура популяции возбудителя сибирской язвы на территории России на основе результатов методов MLST-, MVLST-, canSNP- и MLVA-типирования, с различным уровнем разрешения. А также изучено влияние MVLST-типа штамма *B. anthracis* на его вирулентность для лабораторных животных.

проведена модернизация комплексного подхода иерархического генотипирования штаммов возбудителя сибирской язвы, включая последовательное определение canSNP-группы и MLVA-типирования по схеме MLVA7, позволяющая дифференцировать штаммы и в максимально короткие сроки при минимальных финансовых затратах получить их генетическую характеристику.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены: порядок подтверждения видовой принадлежности штамма *B. anthracis,* определения его плазмидного профиля, проведения canSNP- и MLVA7-типирования, что позволяет получить полноценную генетическую характеристику штамма и наиболее точно определить его относительное филогенетическое положение, что может быть использовано лабораториями, занимающимися проведением эпидемиологических расследований вспышек сибирской язвы (Методические рекомендации «Генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis* перед депонированием в коллекцию культур микроорганизмов», утверждены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 01.07.2021 г., протокол № 5) – учрежденческий уровень внедрения;

депонированы в базу данных GenBank 50 нуклеотидных последовательностей генов факторов патогенности, полученных на основе данных полногеномного секвенирования штаммов *B. anthracis* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН ГНЦ ПМБ, которые могут быть использованы для прикладных и фундаментальных

исследований возбудителя сибирской язвы – международный уровень внедрения;

определена необходимость проведения анимализации, рассева до единичных колоний и подтверждения того, что колонии идентичны по плазмидному составу и MLVA-профилю, перед определением вирулентности штамма *B. anthracis,* это позволит исключить загрязнение посторонними штаммами и возможную гибель спор при длительном хранении.

создан набор олигонуклеотидов для выявления генетических маркеров, указывающих на вероятную принадлежность штамма *B. anthracis* к определенной филогенетической группе и его географическое происхождение, который может быть использован при проведении эпидрасследований и фундаментальных исследований сибиреязвенного микроба (справка о внедрении от 11.10.2022) – лабораторный уровень внедрения;

представлены рекомендации по исследованию выделенного штамма возбудителя сибирской язвы путем генотипирования, а именно, рекомендуется проведение MLVA-генотипирования по схеме MLVA7, как метода генетического анализа первой линии, что позволит с высоким разрешением дифференцировать разные штаммы, выделенные из одной географической точки или источника заражения в максимально короткие сроки

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены с использованием современных методов и средств измерений и приборов, прошедших метрологическую поверку и калибровку, показана воспроизводимость данных в различных условиях.

идея базируется на анализе имеющихся в научной литературе данных отечественных и зарубежных исследователей о филогенетической структуре вида *B. anthracis,* полученных на основе результатов различных методов генотипирования штаммов возбудителя сибирской язвы, на гипотезу об антропогенном распространении возбудителя сибирской язвы по земному шару, а также на предположении о вероятно различной вирулентности штаммов, обладающих различными последовательностями генов факторов патогенности и аминокислотными последовательностями соответствующих белков.

установлено, что штаммы *B. anthracis* разных $MVLST_{pXO1}$-типов статистически достоверно отличаются по вирулентности для мышей и морских свинок. Полученные результаты MVLST-, MLST-, canSNP- и MLVA-типирования показывают качественное совпадение с результатами, представленными в независимых литературных источниках соответствующей тематики.

использованы современные методы обработки информации: сборки нуклеотидных последовательностей по результатам полногеномного секвенирования были осуществлены с использованием программного пакета Lasergene (DNASTAR, США), трансляция *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные – с помощью программного пакета MEGA 7.0., а филогенетический анализ – с помощью программных пакетов MEGA 7.0 и PHYLOViZ 2.0. Для построения дендрограмм были использованы метод невзвешенного попарного среднего (UPGMA) и goeBURST-алгоритм. Уровни значимости (P) были определены с помощью программы «GraphPad Prism 7.0» (GraphPad Software, США). Стандартные отклонения *p* менее чем 0,05 считали статистически значимыми. Индекс биоразнообразия Симпсона рассчитан с помощью программы PHYLOVIZ 2.0.

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных данных, планировании экспериментов, в выполнении молекулярно-биологических и биоинформатических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях

На заседании 03.02.2023 г. диссертационный совет принял решение присудить Гончаровой Ю.О. ученую степень кандидата биологических наук за комплексное решение актуальной задачи, связанной с изучением аллельного полиморфизма генов факторов патогенности *B. anthracis* и корреляции последовательностей этих генов с другими генетическими и фенотипическими признаками, созданием схемы метода мультилокусного сиквенс-типирования генов вирулентности для генотипирования штаммов возбудителя сибирской язвы, а также филогенетической структурой вида *B. anthracis*.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **20** человек, из них **10** докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **20,** против **0**, недействительных бюллетеней **нет.**

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор _____ (Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н. _____ (Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 03.02.2023 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.