

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Гончаровой Юлии Олеговны на тему:
«Аллельный полиморфизм факторов патогенности
сибиреязвенного микроба» на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.11.– микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* - сравнительно «молодой» патогенный вид, отличающийся малой внутривидовой генетической вариабельностью. Для оценки его вариабельности предложены и широко используются методы молекулярного типирования на основе анализа однонуклеотидных полиморфизмов (canSNP- и WGS-SNP-типирование) и нескольких областей генома с вариабельным числом tandemных повторов (MLVA). Основными факторами патогенности *B. anthracis* являются два бинарных экзотоксина и капсула из поли-γ-D-глутаминовой кислоты, компоненты которых кодируются и регулируются соответственно генами плазмид pXO1 и pXO2. Утрата одной или обеих плазмид ведет к снижению вирулентности или отсутствию патогенных свойств штамма. Однако даже штаммы, имеющие обе плазмиды, отличаются вирулентностью для лабораторных животных, что может быть связано с разным уровнем экспрессии генов факторов патогенности, а также наличием мутаций в этих генах, изменяющих функцию белков, кодируемых ими. Поэтому выявление мутаций, коррелирующих с изменениями вирулентности в экспериментах *in vivo*, может определить генетические маркеры различий штаммов по этому признаку. С другой стороны, анализ однонуклеотидных замен в генах факторов патогенности дает возможность внутривидовой дифференциации штаммов. Такой подход, получившее название MVLST (Multi Virulence Locus Sequence Typing), используется для молекулярного типирования *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus aureus*. Возможность использования для типирования *B. anthracis* и высокая дифференцирующая способность MVLST упомянута в единственной работе с анализом *in silico*, однако систематическое изучение аллельного полиморфизма генов и белков факторов патогенности, а также разработка метода MVLST-типирования штаммов возбудителя сибирской язвы *in vitro* и его практическое применение, не описаны. В связи с этим, изучение аллельного полиморфизма генов факторов патогенности *B. anthracis* и корреляции последовательностей этих генов с другими генетическими и фенотипическими признаками, обозначенные как цель диссертационной работы, являются актуальными.

Разделы диссертации «Актуальность исследования» и «Степень разработанности темы исследования», выполненные на основании анализа 14 отечественных и 180 источников



литературы, дают представление о современном состоянии изучаемой проблемы и подводят читателя к цели и задачам работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертантом вынесены на защиту три положения, экспериментальное обоснование которых последовательно описано в рукописи и публикациях по теме диссертации. Все восемь выводов основаны на достаточном объеме фактического материала и результатах исследования, выполненного с использованием современных бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность полученных результатов, которые соответствуют современным научным данным в области молекулярного типирования возбудителей инфекционных болезней, подтверждается статистической обработкой. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, вытекают из результатов исследований и подтверждены фактическим материалом. Научная новизна состоит в использовании метода MVLST для генотипирования сибиреязвенного микроба и установлении того, что одновременный анализ результатов MVLST и других методов генотипирования позволяет выявить комбинации генетических маркеров, указывающих на вероятное географическое происхождение штамма *B. anthracis*. Научная новизна подтверждена депонированием в базу данных GenBank 50 нуклеотидных последовательностей генов факторов патогенности, полученных на основе данных полногеномного секвенирования штаммов *B. anthracis* из коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ – международный уровень внедрения.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что результаты MVLST подтверждают гипотезу об антропогенном распространении *B. anthracis* через Евразию и демонстрации того обстоятельства, что на севере России циркулируют штаммы *B. anthracis*, формирующие в рамках филогенетической группы V.Br.001/002 архаичную подгруппу, эволюционно тесно связанную со штаммами группы V.Br.CNEVA, эндемичной для Центральной Европы.

Практическая значимость результатов

Практическая значимость работы заключается в использовании предложенного в работе порядка подтверждения видовой принадлежности штамма *B. anthracis*, определения его плазмидного профиля, проведения canSNP- и MLVA7- генотипирования, что позволяет получить полноценную генетическую характеристику штамма и наиболее точно определить его относительное филогенетическое положение лабораториями, занимающимися проведением эпидрасследования 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.

Создан набор олигонуклеотидов для выявления генетических маркеров, указывающих на вероятную принадлежность штамма *B. anthracis* к определенной филогенетической группе и его географическое происхождение, а также показана возможность использования метода MLST-генотипирования для определения эволюционной линии штамма *B. anthracis* и его дифференцирования от других видов бацилл при проведении эпидрасследований и фундаментальных исследований сибиреязвенного микроба (справка о внедрении от 11.10.2022) – лабораторный уровень внедрения. Депонированные в базу данных GenBank 50 нуклеотидные последовательности генов факторов патогенности могут быть использованы для прикладных и фундаментальных исследований возбудителя сибирской язвы – международный уровень внедрения.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов.

Личное участие автора заключалось 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 защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль автора была определяющей.

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях, 2 статьи в прочих изданиях и в 6 тезисах материалов международных и Всероссийских научных конференций, на которых они доложены и обсуждены. Публикации содержат полный объем информации, представленной в диссертации.

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 181 странице машинописного текста и иллюстрирована 13 рисунками и 21 таблицей. Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, 5 глав собственных исследований, Заключение, Выводов, Рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, Списка литературных источников и трех Приложений.

Диссертация выполнена в рамках двух плановых НИР ФБУН ГНЦ ПМБ.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность.



Во введении кратко охарактеризован возбудитель сибирской язвы, его систематика, факторы патогенности, описание метода MVLST, охарактеризована степень разработанности темы исследования, определено направление исследования и обоснована его актуальность; сформулирована цель и задачи работы, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость; положения, выносимые на защиту, сведения об апробации, публикациях, степени достоверности результатов соответствующие требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по этим пунктам.

Обзор литературы (глава 1) состоит из четырех подразделов. В первом разделе дана характеристика сибиреязвенной инфекции с описанием жизненного цикла, сведения о заболеваемости людей и животных, распространении инфекции. Второй подраздел описывает клинические проявления сибиреязвенной инфекции. Подраздел 1.3. посвящен факторам патогенности *B. anthracis*. Следующий раздел 1.4. описывает методы генотипирования сибиреязвенного микроба, включая *can*SNP-, MLVA-, MVLST- типирование. В заключении по обзору литературы автор приход к выводу о необходимости изучения полиморфизма генов патогенности и распространения MVLST-генотипов в глобальной популяции. Литературный обзор выполнен очень хорошо и дает представление об уровне разработки темы и цели предстоящего исследования. Однако можно отметить, что раздел о клинических формах сибирской язвы не связан непосредственно с темой исследования.

Во второй главе описаны материалы и методы исследований. В ней приведен перечень из 60 штаммов *B. anthracis* и одного штамма *Bacillus cereus* из коллекции института, 146 геномов штаммов *B. anthracis*, штамма *B. cereus biovar anthracis* и 3 штаммов *B. cereus* из базы данных GenBank. Далее описаны питательные среды, методы определения вирулентности штаммов и иммунизации животных, методы выделения ДНК, секвенирования, ПЦР, затем следует описание методов определения плазмидного профиля штамма *B. anthracis* и его дифференцирование от близкородственных видов бацилл, MVLST-генотипирования и *can*SNP-генотипирования. Завершается раздел описанием MLST-типирования и методами биоинформационного и статистического анализа.

Глава 3 «Генотипирование сибиреязвенного микроба» начинается с *can*SNP-генотипирования. Штаммы из коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ относились к 6 из 13 *can*SNP-групп. Следующий подраздел описывает результаты MLVA-типирования, которое было проведено по 7 и 17 VNTR-локусам. Показано, что даже MLVA7 имеет высокий индекс биоразнообразия, для 58 штаммов *B. anthracis* идентифицировано 25 MLVA7-генотипов и 35 MLVA17-генотипов. MLST-типирование продемонстрировало низкую разрешающую способность для *B. anthracis*, что подтверждает известные литературные данные и позволяет оценить сравнительную эффективность этих методов генотипирования.



Глава 4 посвящена анализу аллельного полиморфизма генов факторов патогенности. Отдельно определен полиморфизм генов плазмид рХО1, рХО2 и гена антролизина *O alo*. Для генов рХО1 выявлено 20 генотипов и вариабельность проявлялось только в однонуклеотидных заменах. Выявлены изоформы транслированных белков CapB, CapC, CapA, CapD, AspA и AspB. Анализ аллельного полиморфизма гена *alo* выявил 7 сиквенс-типов, из которых 4 типа характерны для *B. anthracis*, трансляция нуклеотидов дала 4 изоформы белка Alo. Иных, кроме однонуклеотидных замен, полиморфизмов не обнаружено. Установлено радикальное отличие этого белка у штаммов *B. cereus*.

Глава 5 «Анализ результатов филогенетического исследования», самая большая по объему, включает 7 подразделов. В двух из них предпринята попытка выявить связи между географическим происхождением штаммов, их MVLST-GT и другими генетическими признаками. Полученные результаты позволили прийти к заключениям о существовании уникальных мутаций генов *pagA*, *суа*, *capC* у штаммов групп A.Br.008/009 и A.Br.Aust94, выделяемых в определенных географических областях. Показана возможность дифференцирования эволюционных линий А и В на основе анализа локуса VNTRcapA.

MLST-типирование, как показано в работе, соответствует ее разделению на основные эволюционные линии (А, В, С) и позволяет уверенно дифференцировать штаммы *B. anthracis* от штаммов *B. cereus* и даже *B. cereus* *bv. anthracis*.

По результатам работы создана панель олигонуклеотидов, позволяющая методом аллель-специфичной ПЦР определить филогенетическую принадлежность штаммов возбудителя сибирской язвы эволюционных линий А, В и С, а также подгрупп штаммов canSNP-групп A.Br.008/011 и A.Br.Aust94, выделенных на территории Кавказа.

Глава 6 посвящена поиску связи между филогенетической принадлежностью штамма и его вирулентностью. Выявлены причины значительного снижения вирулентности штаммами, показано, что различия последовательности основных факторов патогенности могут влиять на вирулентность штаммов. В опытах с заражением лабораторных животных показано, что штаммы с генотипом рХО1-GT3, который имели штаммы наиболее распространенной группы A.Br.008/009, достоверно менее вирулентны, чем изоляты всех остальных изученных групп.

В Заключение констатируется, что систематическое использование MVLST для возбудителя сибирской язвы позволит наряду с описанием внутривидовой структуры выявить маркеры географического происхождения штаммов. Выражается уверенность в детальном описании результатов этого подхода, полученного впервые, и в том, что он может быть использован для описания филогенетической структуры глобальной популяции *B. anthracis*, а данные о генетических маркерах географического происхождения - при эпидемических расследованиях.



Восемь выводов логично основываются на полученных результатах, не вызывают сомнения в их достоверности и находятся в соответствии со всеми решенными задачами и вынесенными на защиту положениями. Диссертация носит завершённый характер. Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе в целом.

Представленная на отзыв диссертация Гончаровой Юлии Олеговны на тему «Аллельный полиморфизм факторов патогенности сибиреязвенного микроба» по специальности 1.5.11.– «микробиология» на соискание ученой степени кандидата биологических наук имеет очевидную теоретическую и практическую ценность, а ее автор проявила себя как состоявший квалифицированный исследователь. Диссертация выдержана в хорошем научном стиле изложения обработанной информации. К достоинствам работы можно отнести высокий методический уровень и глубокий анализ результатов исследования.

Диссертация Гончаровой Юлии Олеговны является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи – определения корреляции вирулентности штаммов возбудителя сибирской язвы с вариантами аллелей генов и белков факторов патогенности.

Замечания. Принципиальных замечаний по диссертации нет.

При анализе диссертационной работы возник **вопрос**:

Уважаемая Юлия Олеговна, чем, на Ваш взгляд, можно объяснить отмеченное Вами то обстоятельство, что в ряде случаев один MVLST-генотип объединяет несколько canSNP-групп и наоборот – canSNP-группа делится на несколько генотипов?

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней».

Рецензируемая работа соответствует отрасли науки «Биологические науки», паспорту специальности 1.5.11.– Микробиология по пунктам 1 «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 4 «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне», что обосновано целью, задачами, положениями, вынесенными на защиту, полученными результатами и выводами. По актуальности поставленной проблемы, методическому уровню ее решения, теоретической и практической значимости результатов диссертация соответствует требованиям п.9-14 «Положения о присуждении научных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., с изменениями, утвержденными постановлениями Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г., №426 от 20.03.2021 г., №1539 от



11.09.2021 г., предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор Гончарова Юлия Олеговна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11.– «микробиология».

Официальный оппонент,
Еременко Евгений Иванович,
доктор медицинских наук, профессор, Микробиология
355035, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Советская, д.13-15,
Тел.7(865-2)26-03-12, 7(961)454 96-25,
ejer@mail.ru
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора,
главный научный сотрудник
лаборатории сибирской язвы

Е.И. Еременко

9 января 2023 г.

Подпись Е.И. Еременко удостоверяю:

Начальник отдела кадров



С.М. Исмаилова