

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента о научно-практической ценности  
диссертационной работы Левченко Дарьи Александровны  
«Анализ результатов микробиологического мониторинга холерных  
вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской  
Федерации с 1989 г. по 2016 г.»,  
представленной на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук  
по специальности 03.02.03 - Микробиология**

### **Актуальность темы диссертации**

Эпидемическая ситуация по холере во всем мире до сих пор продолжает оставаться достаточно напряженной. В Российской Федерации за последние десять лет отмечены эпизодические заносы без распространения (2010 г., 2012 г., 2014 г.), а также не связанные с ними единичные случаи обнаружения в объектах окружающей среды токсигенных штаммов холерных вибрионов. Наряду с этим ежегодно из воды открытых водоемов выделяются десятки нетоксигенных штаммов вибрионов O1 и не-O1 не-O139 серогрупп, участились случаи детекции штаммов *Vibrio cholerae* O1 (ctxA-tcrA+). Практически ежегодно регистрируются случаи заболевания людей, вызванные такими вибрионами. Представляет интерес тот факт, что на отдельных территориях РФ отмечается выделение нетоксигенных штаммов холерных вибрионов на протяжении нескольких месяцев и/или лет. Однако данных о фенотипических и генетических свойствах вибрионов, выделенных в процессе многолетних мониторинговых исследований на территории Российской Федерации, недостаточно. В связи с этим актуальность темы диссертационной работы Левченко Д.А. не вызывает сомнения. Выполнение расширенной идентификации вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды, с помощью молекулярно-генетических методов может быть осложнено тем, что водные популяции холерных вибрионов Эль Тор отличаются высокой генетической неоднородностью. В связи с этим, важное значение приобретает разработка методических подходов для генотипирования таких вибрионов с привязкой к временному и

пространственному формату, с возможностью определения сходства и различия отдельных культур патогена. Не менее актуальным является разработка единого подхода для систематизации данных изучения различных по происхождению и токсигенности штаммов *V. cholerae* O1, O139, выделенных из объектов окружающей среды, с использованием информационных технологий (ГИС) и создание пополняемой базы данных.

### **Научная повизна, теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования**

Левченко Д.А. разработал способ генотипирования нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor на основании выявления методом ПЦР фрагментов четырнадцати генов, ассоциированных с токсигенностью, эпидемической значимостью и персистенцией патогена. Способ подтвержден заявкой на изобретение.

Анализ с использованием предложенного подхода 408 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов показал, что они принадлежат к 81 генотипу, которые составляют десять кластеров, при этом в некоторых водных объектах окружающей среды на территории Федеральных округов и субъектов Российской Федерации наблюдалась циркуляция штаммов вибрионов с одинаковым генотипом на протяжении от одного года до нескольких лет. Полученные Левченко Д.А. результаты указывают на перспективность применения разработанного способа генотипирования холерных вибрионов при проведении микробиологического мониторинга за холерой.

Левченко Д.А. впервые создана пополняемая БД ГИС «Холера 1989-2014», которая содержит результаты микробиологических и молекулярно-биологических исследований штаммов холерных вибрионов, выделенных из водных объектов при осуществлении мониторинга на территории России, и обеспечивает возможность проведения сравнительного анализа изолированных культур патогена по фенотипу и генотипу, а также оценки

реальной ситуации по контаминации объектов окружающей среды штаммами *V. cholerae* O1, O139 в динамике по Федеральным округам, субъектам и конкретным водным объектам.

Полученные Левченко Д.А. данные представляют интерес для решения вопросов персистенции штаммов возбудителя холеры в объектах окружающей среды в течении одного или нескольких лет.

По результатам исследования были разработаны методические рекомендации учрежденческого уровня, которые успешно внедрены в работу ФКУЗ Ростовский-на Дону противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Предложенная БД ГИС «Холера 1989-2014» зарегистрирована в Роспатенте и интегрирована в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений**

При выполнении экспериментальной работы Левченко Д.А. использовала микробиологические, биохимические, серологические, молекулярно-генетические, биоинформационные методы исследования, выбор которых полностью соответствовал цели и задачам. Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертационной работы логично вытекают из полученных в ходе экспериментальной работы данных. Результаты диссертационного исследования статистически обработаны с использованием достаточного количества показателей.

## **Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению**

Работа Левченко Д.А. представляет собой законченное научное исследование, которое отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалов и методов, пяти глав экспериментальных исследований, заключения и выводов. Список использованной литературы включает 211 источников (156 отечественных и 55 иностранных).

Во введении сформулированы цель и задачи исследования, определены положения, выносимые на защиту. Показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» приведен анализ тенденций и особенностей эпидемиологической ситуации по холере на современном этапе развития седьмой пандемии в мире и на территории Российской Федерации, рассмотрены результаты микробиологических мониторинговых исследований объектов окружающей среды на наличие холерных вибрионов O1, O139 серогрупп, показаны возможности применения современных информационно-аналитических ресурсов в мониторинге инфекционных заболеваний на территории Российской Федерации, в том числе особо опасных инфекций.

В главе «Материалы и методы» представлены коллекционные штаммы холерных вибрионов, используемые питательные среды, подробно описаны бактериологические и молекулярно-генетические методы исследования. Статистическая обработка экспериментальных данных не вызывает сомнений в достоверности полученных диссертантом результатов.

Результаты собственных исследований представлены пятью главами. В первой главе Левченко Д.А. провела анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из объектов окружающей среды на территориях субъектов Российской Федерации с 1989 г. по 2016 г. Особый

интерес представляют данные полученные при использовании критерия привязки к конкретным объектам окружающей среды на территории России. Показано, что в некоторых объектах окружающей среды выделение холерных вибрионов наблюдается в течение года или нескольких лет, тогда как в других - только единичные выделения (без повторения во временном сегменте).

Исходя из полученных данных Левченко Д.А. делает логичное предположение о возможности нескольких путей попадания нетоксигенных штаммов холерных вибрионов в данные водные объекты: переживание, занос или и то и другое. Для решения данного вопроса были изучены фенотипические и генетические свойства штаммов холерных вибрионов, изолированных из поверхностных водоёмов и стоков на территории Российской Федерации. Результаты исследования представлены во второй экспериментальной главе.

В третьей главе собственных исследований представлена разработка пополняемой базы данных геоинформационная система «ХОЛЕРА 1989-2014» и алгоритма работы с ней. При работе с подготовленной базой данных возникла очевидна необходимость разработки нового методического приема для генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, который характеризовался бы высокой дискриминирующей способностью, быстротой выполнения и низкой себестоимостью.

Исследования по данному направлению представлены в четвертой экспериментальной главе. Показано, что сокращение числа выявляемых маркеров с 39 до 14 не приводит к изменению дискриминирующей силы генотипирования. В ходе дальнейших исследований был осуществлен анализ встречаемости генотипов водных нетоксигенных штаммов холерных вибрионов в различных Федеральных округах и субъектах Российской Федерации и в разные сроки.

В пятой главе собственных исследований нашли отражения данные по практическому использованию предложенного подхода генотипирования

нетоксигенных штаммов холерных вибрионов и разработанной базы данных для изучения штаммов *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA-tcpA+* и культур, выделенных из водных экосистем на территории Краснодарского края. Для углубленного изучения штаммов *V. cholerae* O1 (*ctxA-tcpA+*) Левченко Д.А. дополнительно использовала методом MLVA. Полученные результаты позволили обоснованно сделать предположение о заносном происхождении *V. cholerae* O1 (*ctxA-tcpA+*), которые, попадая в объекты окружающей среды на территории России, могут непродолжительно сохраняться (переживать).

При анализе пространственной и временной динамики выделения штаммов холерных вибрионов с определенным генотипом на территории Краснодарского края установлено, что в течение нескольких лет на отдельных территориях наблюдалось выделение культур патогена с одинаковым генотипом. Особый интерес представляют данные о выделении на определенном промежутке времени из р. Агура штаммов холерных вибрионов с генотипом, ранее не встречающимся на данной территории, при этом количество изолированных культур с такими свойствами было 89. Полученные данные по мнению Левченко Д.А. подтверждают высокую разрешающую способность предложенного подхода генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы и свидетельствуют о возможности переживания нетоксигенных вибрионов на протяжении нескольких лет в водоемах южных широт.

Приведенное в диссертационной работе «Заключение» показывает способность автора анализировать полученные в ходе проведения экспериментальной работы данные, адекватно резюмирует основные результаты и обосновывает перспективы их практического применения.

Выводы полностью соответствуют цели и задачам диссертационного исследования, подтверждены достаточным объемом экспериментального материала и являются логическим завершением представленной работы.

При общей высокой положительной оценке работы имеется ряд вопросов и замечаний:

1. В главе «Обзор литературы» современное состояние молекулярно-генетической характеристики холерных вибрионов представлено очень кратко, хотя выполнение работы предусматривало идентификация исследуемых штаммов вибрионов с помощью молекулярно-генетических методов.
2. Насколько совпадала кластеризация изученных штаммов холерных вибрионов при использовании для проведения исследования 39 и 14 генетических маркеров?
3. Почему в таблице 22 полученные генотипы нетоксигенных штаммов холерных вибрионов представлены не самостоятельно, а указана их общая характеристика для кластера? В дальнейшем был проведен анализ встречаемости выявленных генотипов в зависимости от места и времени выделения, поэтому необходимость подробной характеристики генотипов очевидна.
4. Почему при анализе результатов распределения VNTR и ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 (*ctxA-tcpA*), изолированных из водных объектов на территории РФ с 2001 г. по 2016 г., не были учтено место выделение данных культур? Это могло бы объяснить почему для штаммов, изолированных в 2003 г. характерны различные генотипы при одинаковом MLVA-профиле - разные места выделения, а в 2005 г. - одинаковый генотип при нескольких MLVA-профилях - одно место выделения.
5. В выводе номер четыре значение дискриминирующей силы отражает эффективность метода генотипирования, но не генов-мишеней.
6. В выводе номер шесть резюмирующая часть слишком категорична. Утверждение о том, что штаммы холерных вибрионов, выделенные из р. Агура и имеющие новый (ранее не встречавшийся на этой территории) генотип имеют заносной характер, может рассматриваться только как предположение.

7. Первое положение выносимое на защиту нуждается в некоторой коррекции и уточнении, поскольку значимость микробиологических исследований при мониторинге любых возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы, является устоявшимся фактом, не требующим дополнительных доказательств. В этой связи, более логично выглядело бы утверждение о эффективности применения комплекса микробиологических подходов, используемых в рамках данного диссертационного исследования при изучении свойств холерных вибрионов.

### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат диссертации Левченко Дарьи Александровны «Анализ результатов микробиологического мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 г. по 2016 г.» в полной мере отражает цель, задачи и основные положения диссертации. Все результаты экспериментальной работы отражены в автореферате.

### **Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати**

По теме диссертации опубликовано 45 работ, в том числе 8 в изданиях рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных исследований. Материалы диссертации широко апробированы на всероссийских и международных конференциях.

### **Заключение**

Диссертация Левченко Дарьи Александровны «Анализ результатов микробиологического мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 г. по 2016



г.» представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости, уровню экспериментальных исследований диссертационная работа «Анализ результатов микробиологического мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 г. по 2016 г.» в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.13 г., с изменениями в редакции постановлений РФ № 335 от 21.04.16 г., № 748 от 02.08.16 г., № 650 от 29.05.17 г., № 1024 от 28.08.17 г., предъявляемым ВАК Минобрнауки России к кандидатским диссертациям, а ее автор Левченко Дарья Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Заведующая лабораторией  
молекулярной диагностики  
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  
по специальности 03.02.03 – Микробиология



Н.А. Осина

410005, г. Саратов,  
ул. Университетская, 46  
Тел. 8(8452) 51-52-12, 89198278822

