

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Мироновой Лилии Валерьевны «Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Работа выполнена в ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках плановых научных тем: «Экологические аспекты эпиднадзора за холерой на территории Сибири и Дальнего Востока» (№ ГР 01.20.0013861); «Эколого-эпидемиологические и молекулярно-биологические закономерности проявлений седьмой пандемии холеры в Сибири и на Дальнем Востоке» (№ ГР 01201068); «Характеристика биологических свойств и генетической организации холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации» (№ ГР 01201352135); «Молекулярные основы персистенции, эпидемического и патогенетического потенциала холерных вибрионов различного происхождения» (№ ГР 182-4-16), а также тем НИР, выполняемых по Федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 гг.)» и Отраслевой программе «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011-2015 гг.).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, двух глав аналитического обзора литературы, шести глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы (428 цитируемых работ, в том числе 109 отечественных и 319 зарубежных авторов). Работа изложена на 357 страницах, включает 41 таблицу и 87 рисунков

Актуальность темы диссертационного исследования

Холера – древняя болезнь человека – продолжает вызывать эпидемии, несмотря на непрекращающиеся попытки ограничить её распространение, и, представляя постоянную угрозу для населения, является социально значимой и актуальной проблемой для здравоохранения всего мира.

Эпидемиологический надзор за холерой в России обеспечивает систему мер для своевременного выявления заносных и местных случаев холеры. На современном этапе актуальными являются исследования, направленные на изучение молекулярно-генетических структур, ответственных за токсигенность и эпидемичность обнаруживаемых в геномах выделяемых или детектируемых холерных вибрионов при мониторинге за возбудителем инфекции в объектах окружающей среды и в биологическом материале от человека с использованием новейших технологий, обладающих высокой точностью и разрешающей способностью, широким спектром идентифицирующих микроорганизмов, высокой скоростью и производительностью, надежностью и простотой исполнения.

В свете сказанного, сформулированная соискателем цель работы, заключающаяся в «совершенствовании микробиологического мониторинга и оценка популяционной гетерогенности *Vibrio cholerae* на основе комплексного анализа особенностей структурной организации отдельных локусов генома, протеомного профиля и механизмов трансформации возбудителя», является обоснованной и актуальной.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, репрезентативность эмпирического материала.

Автором непосредственно определены актуальность, цель, методология исследования, проведен сбор и анализ данных научной литературы по разрабатываемой проблеме, лично и при ее непосредственном участии спланированы и выполнены молекулярно-генетические и генотипические исследования с использованием новейших молекулярных технологий,

исследования с использованием новейших молекулярных технологий, проведен анализ и интерпретация статистически обработанных результатов, делая их репрезентативными. Отдельные этапы по молекулярному типированию, MALDI-ToF масс-спектрометрии и экспериментальному исследованию стабильности генотипа *V. cholerae* проведены совместно с сотрудниками лаборатории холеры и отдела эпидемиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках выполнения комплексных тем НИР.

Формирование окончательной версии базы данных референсных белковых профилей масс-спектров *V. cholerae* проводилось совместно со специалистами ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Новизна исследований и полученных результатов, выводов и результатов, сформулированных в диссертации.

Анализ материалов диссертации Мироновой Л.В. позволяет прийти к заключению, что работа обладает несомненной научной новизной.

Анализируя данные современной научной литературы, автор акцентирует внимание читателя на том, что седьмая пандемия холеры, начавшаяся в 1961 г. на о. Сулавеси (Индонезия), продолжается, оставаясь серьезной проблемой здравоохранения в мире. Важной закономерностью эпидемического процесса холеры является способность этиологического агента сохраняться и накапливаться в объектах окружающей среды (первичные и вторичные эндемические очаги), что обусловлено широким спектром адаптационной трансформации его биологических свойств с одной стороны и особенностями водных экосистем и климатогеографическими характеристиками территории – с другой. При этом геном возбудителя холеры характеризуется высокой пластичностью за счет наличия большого количества мобильных генетических элементов с локализованными в их составе генами патогенности, пандемичности, персистенции. Это свойства генома определяет вероятно

оптимальных для этого условий среды обитания, что является движущей силой эволюции и приводит к формированию генетически измененных вариантов возбудителя. С целью научного обоснования совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *V. cholerae* в системе микробиологического мониторинга автор изучила роль методов молекулярного типирования в эпидемиологическом и филогенетическом анализе холерного вибриона и провела оценку эффективности внедрения молекулярных технологий в систему лабораторной диагностики холеры. При этом показана информативность ПЦР-скрининга с целью индикации детерминант холерного вибриона в обогащенных пробах объектов окружающей среды. Установлена высокая аналитическая и диагностическая ценность определения таксономической принадлежности к роду *Vibrio* по профилю константных белков микробной клетки на основе MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа. Следует отметить трудоемкую работу автора в разработке методологических основ идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* на основе MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа. Дело в том, что в поставляемых в РФ программных пакетах MALDI Biotyper отсутствуют данные о масс-спектрах микроорганизмов вида *V. cholerae*. Для получения референсных спектров использовались белковые экстракты пяти типичных охарактеризованных по комплексу культуральных морфологических, биохимических, серологических и молекулярно-генетических свойств штаммов *V. cholerae*, в т.ч. трех O1 серогруппы обоих биоваров и эпидемической значимости (*V. cholerae* O1 Classical 569 B, *V. cholerae* O1 El Tor M-878, *V. cholerae* O1 El Tor И-638), одного – O139 серогруппы (*V. cholerae* O139 И-13) и одного – *V. cholerae* non O1/O139 P- 9741. Полученные референсные спектры импортировались в базу данных программы MALDI Biotyper 3.0, которая использовалась для дальнейшей работы. Отработан также способ пробоподготовки: при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности применяли прямое нанесение бактериальной культуры на пластинку MS-чипа с последующим нанесением матрицы, при работе с

микроорганизмами II группы патогенности сначала получали стерильные белковые препараты *V. cholerae* (спиртовая обработка бактериальной взвеси с последующей экстракцией муравьиной кислотой и ацетонитрилом), которые и наносили на пластинку MS-чипа с последующим нанесением матрицы. В процессе идентификации исследованные штаммы вибрионов отнесены к виду *V. cholerae* со значением SV 2,3 и более. Значения SV в диапазоне от 2,0 до 2,3 установлены для штаммов *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* и *V. cholerae* non O1/O139. Меньший индекс совпадений отмечен для *V. metschnikovii* – 1,95-1,97 (Глава 5. Молекулярно-генетические аспекты индикации и идентификации *V. cholerae* и дифференциации микроорганизмов рода *Vibrio*).

С помощью ПЦР-анализа впервые установлен завоз на территорию Сибири и Дальнего Востока генетически измененных вариантов холерного вибриона биовара Эль Тор, несущих классическую аллель гена субъединицы В холерного токсина. С применением разработанной схемы генотипирования измененных клонов *V. cholerae* O1 El Tor по комплексу ассоциированных с патогенностью детерминант (*ctxB*, *rstC*, *rstR*, *tbr*, TLC) установлена дифференциация их на генотипы. Показана целесообразность применения данной схемы типирования в эпидемиологическом расследовании случаев завоза инфекции, а также для анализа структурных особенностей генома измененных клонов холерного вибриона биовара Эль Тор.

Впервые по результатам полногеномного SNP-типирования показана принадлежность изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока при эпидемических осложнениях в 1990-е гг. штаммов *V. cholerae* El Tor ккладам второй и третьей волн глобального распространения холеры, определены структурные особенности и вероятные источники завоза различных клонов возбудителя.

На основании макрорестрикционного картирования хромосомной ДНК, изучения числа переменных тандемных повторов и определения нуклеотидной последовательности генов «домашнего хозяйства»

охарактеризована клональная структура популяций *V. cholerae* при разных эпидситуациях в Сибири и на Дальнем Востоке и дана оценка эффективности и значимости применения отдельных методов типирования в молекулярно-эпидемиологическом или филогенетическом анализе.

Впервые проведен молекулярно-эпидемиологический анализ осложнений по холере в регионе по результатам комплексной характеристики генетических локусов. Установлена клональность отдельных вспышек с формированием субклональных близкородственных вариантов патогена в период эпидемических осложнений.

Выявлены участки водных объектов сибирского и дальневосточного регионов, в которых нетоксигенный холерный вибрион обнаруживается на протяжении ряда лет, т.н. «участки риска», требующие комплексного подхода при организации и проведении мониторинговых исследований. Установлена возможность кратковременного закрепления (2-3 года) или длительной персистенции штаммов *V. cholerae* определенных MLVA-профилей в водных экосистемах на отдельных территориях с трансформацией генотипа и формированием близкородственных однолокусных вариантов холерного вибриона.

Впервые показано, что в экспериментальных условиях при воздействии неблагоприятных факторов среды возможна трансформация MLVA- и PFGE-профилей холерного вибриона при сохранении стабильности структуры генов «домашнего хозяйства». Установлено, что большей способностью к генетической изменчивости характеризуются геноварианты вибриона Эль Тор с классической аллелью гена субъединицы В холерного токсина.

Теоретическая значимость работы. Охарактеризованы молекулярно-эпидемиологические механизмы возникновения и развития эпидемических осложнений на неэндемичных территориях Сибири и Дальнего Востока, заключающиеся в завозе сформированных в эндемичных очагах высокоинфекционных клональных вариантов возбудителя и возможной последующей дивергенции на близкородственные субклоны в процессе

пребывания в объектах окружающей среды или при пассаже через восприимчивый организм в период вспышки.

На основании выявленных особенностей структурной организации генетически измененных вариантов *V. cholerae* El Tor на разных этапах седьмой пандемии высказана гипотеза о формировании новых клонов за счет трансформации Эль Тор-специфического СТХ профага и реорганизации сцепленных с ним генетических блоков.

Определены вероятные направления микроэволюционных преобразований холерного вибриона в процессе персистенции в водных экосистемах региона, выражающиеся в изменении MLVA-профиля с формированием однолокусных вариантов микроорганизма.

Выявлены закономерности адаптационной изменчивости и трансформации генома холерного вибриона при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды. Первичная реакция генома на стрессовое воздействие преимущественно заключается в обратимой модификации по типу дупликации/амплификации локусов, тогда как в более поздние сроки задействуются механизмы более глубокой изменчивости. В неблагоприятных условиях среды, наряду с формированием измененных субклонов, происходят последовательные фенотипические адаптационные преобразования *V. cholerae*, в частности, формирование «персистирующего» фенотипа, а в дальнейшем, при воздействии стрессовых условий, – переход в некультивируемое состояние с сохранением в популяции покоящихся форм вариантов возбудителя с исходными молекулярно-генетическими характеристиками.

Установлена эволюционная дистанцированность *V. cholerae* El Tor разной эпидемической значимости. На основании оценки особенностей организации генов жизнеобеспечения показано, что *ctxAB-tcpA*⁺ варианты *V. cholerae* из окружающей среды являются самостоятельной клональной линией, демонстрирующей большой уровень гомологии указанных участков генома с эпидемически опасными штаммами холерного вибриона.

Теоретически обоснован комплексный дифференцированный подход к применению молекулярных методов в анализе структуры популяции *V. cholerae*, выяснении закономерностей развития эпидемических осложнений и изучении филогенетической истории возбудителя.

Практическая значимость работы. Предложен и апробирован в рамках многолетнего мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов подход к ПЦР-скринингу видо- и серогруппоспецифических генетических детерминант холерного вибриона в обогащенных пробах из объектов окружающей среды.

Сформирована и интегрирована в программу MALDI Biotyper 3,0 панель референсных масс-спектров *V. cholerae*, обеспечивающая возможность ускоренной идентификации микроорганизма на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии. Разработаны методологические основы и алгоритм применения MALDI-ToF масс-спектрометрии в лабораторной диагностике холеры, предусматривающий дифференцированный подход к пробоподготовке с учетом потенциальной биологической опасности исследуемого образца.

Разработана схема генотипирования атипичных вариантов *V. cholerae* O1 El Tor по комплексу ассоциированных с патогенностью возбудителя детерминант (*ctxB*, *rstC*, *rstR*, *tbr*, TLC).

Усовершенствован алгоритм применения молекулярных методов в системе микробиологического мониторинга холеры.

Разработанные и усовершенствованные подходы к идентификации и молекулярному типированию *V. cholerae* включены в нормативно-методические документы федерального уровня: Методические указания МУ 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (Москва, 2011); Методические рекомендации МР 4.2.0090-14 «Использование методов полиморфизма длин рестриционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I–II групп патогенности» (Москва, 2015); Методические рекомендации МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-

спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I—II групп патогенности» (Москва, 2015).

На основании результатов исследования подготовлены информационные письма «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2013 г. и прогнозе на 2014 г.», «О ситуации по холере в Сибирском и Дальневосточных регионах в 2014 г. и прогнозе на 2015 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2015 г. и прогнозе на 2016 г.».

Материалы диссертационной работы послужили основой для подготовки методических рекомендаций: «Типирование штаммов *Vibrio cholerae* методом мультилокусного анализа переменных тандемных повторов (MLVA)» (Иркутск, 2010); «Выявление и генетический анализ атипичных вариантов *Vibrio cholerae* El Tor» (Иркутск, 2011); «Молекулярное типирование *Vibrio cholerae* с использованием пульс-электрофореза» (Иркутск, 2011); «Алгоритм создания геоинформационной системы пространственного распространения возбудителей опасных инфекционных болезней (на примере г. Иркутска)» (Иркутск, 2014); «Алгоритм анализа результатов мультилокусного сиквенс-типирования» (Иркутск, 2015).

Результаты исследования вошли в учебно-методические пособия: Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (Москва, 2013 г.); Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике холеры для врачей-бактериологов (биологов) и преподавателей (Иркутск, 2012); Учебно-методическое пособие по лабораторной диагностике холеры (Иркутск, 2014).

Практическая значимость исследований подтверждена созданными на основе полученных материалов базами данных: «*Vibrio cholerae* eltor. Сибирь и Дальний Восток» (свидетельство о регистрации № 2012620754 от 10.08.2012 г.); «Географическая информационная система *Vibrio cholerae* O1 и O139, г. Иркутск» (свидетельство о регистрации № 2015620466 от 10.03.2015 г.); «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности

для программы MALDI Biotyper» (свидетельство о регистрации № 2016620345 от 15.03.2016 г.) и «*V. cholerae*. Сибирь и Дальний Восток – Амплификационный профиль_MLVA-генотип» (свидетельство о регистрации № 2016620904 от 1.07.2016 г.).

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы штаммы: контрольные для типирования по комплексу ассоциированных с патогенностью детерминант – *V. cholerae* El Tor B-6892, *V. cholerae* El Tor B-6893, *V. cholerae* El Tor B-6894, *V. cholerae* El Tor B-6895 (свидетельства о депонировании № 245, 246, 247, 248 от 26.10.2011 г.); *V. cholerae* El Tor B-7521 с генотипом *ctxAB-tcpA+* и уникальным числом повторов в локусе *VcB* (свидетельство о депонировании № 1 от 24.01.2014 г.); *V. cholerae* El Tor B-7595 – спонтанный мутант, утративший комплекс ассоциированных с патогенностью генетических блоков (профаг СТХ – гены *ctxAB*, *rstR*; профаг RS1 – гены *rstR*, *rstC*; токсин-связанный криптический элемент – TLC) (свидетельство о депонировании № 48 от 25.02.2014 г.).

В международную базу данных GenBank депонировано 184 нуклеотидных последовательности генов *V. cholerae*, в т.ч. 21 последовательность гена *ctxB* (регистрационные номера HM345946, HM366176-HM366179, HM590452-HM590461, HM595735-HM595740); 145 последовательностей генов «домашнего хозяйства» (регистрационные номера KC290712-KC290722, KC306672-KC306693, KC311931-KC311938, KP120556, KP863719-KP863735, KP872307-KP872318, KF381324-KF381327, KF421814-KF421817, KF476604-KF476615, KF498628-KF498631, KF500058-KF500065, KF540041-KF540046, KJ670164-KJ670177, JN411691, JN571738, JN579649-JN579655, JN591379-JN591384, JN607476-JN607480, JN622162, JN622163); 78 последовательностей таксономически информативных генов *16S rRNA*, *rpoB* (регистрационные номера KM396324-KM396331, KM364536, KM209331-KM209333, KM262182-KM262187). Драфт-геномы четырех штаммов *V. cholerae* El Tor размещены в

GenBank (регистрационные номера проектов: JPLT00000000, LUCN00000000, JZCC00000000, LYXT00000000).

Научные и практически значимые материалы диссертационных исследований включены в лекционные курсы дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Степень достоверности результатов исследования О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных, высокочувствительных и специфичных методов с автоматизированным учетом и оценкой результатов, комплексным подходом к молекулярно-генетическому анализу, применением различных технологий конструирования дендрограмм и адекватных методов статистической обработки полученных данных. Выводы обоснованы фактическим экспериментальным материалом, соответствуют полученным результатам, отражают задачи исследования.

Диссертация и автореферат написаны литературным языком, хорошо иллюстрированы. Отдельные неточности орфографического характера не снижают достоинств работы. Положения, выносимые на защиту, выводы диссертации конкретны и полностью отражают результаты проведенных исследований. В автореферате изложены основные положения диссертации, а материалы самой диссертации достаточно полно отражены в 65 опубликованных работах, 15 из которых – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России.

Заключение.

Диссертационная работа Лилии Валерьевны Мироновой «Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга» выполнена на актуальную тему, является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, имеющей научную ценность и

практическую направленность, содержащей новое решение научной задачи, имеющей существенное значение в решении проблемы совершенствования алгоритма применения молекулярных методов в системе микробиологического мониторинга холеры, соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842, предъявляемым к диссертационным работам, представляемым на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, а автор диссертации Миронова Л.В. заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по заявленной специальности.

Заведующий лабораторией диагностики холеры и других кишечных инфекций,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
доктор медицинских наук, с.н.с.

Савельев Вилорий Николаевич

355035, г. Ставрополь, ул. Советская 13-15,

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт

Роспотребнадзора, телефон 8-(865-2)-26-03-12;

E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Савельев

В.Н. Савельев

Подпись Савельева В.Н. заверяю.

Начальник отдела кадров

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора



Демченко
В.В. Демченко