

## ОТЗЫВ

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

**Актуальность проблемы.** Сохраняющаяся актуальность проблемы холеры в мире связана с существованием эндемичных очагов на Африканском континенте, в странах Азии и Америки и реальной угрозой выноса инфекции за их пределы, что подтверждается периодической регистрацией трансграничных и трансконтинентальных завозов возбудителя на свободные от холеры территории. На фоне наблюдающегося в последние годы снижения интенсивности эпидемических проявлений инфекции в странах Карибского бассейна, отмечается рост числа случаев заболевания холерой в странах Азии (Афганистан, Ирак, Индия, Непал, Йемен и др.). Такая ситуация представляет существенную опасность в плане завоза инфекции как в Россию в целом, так и в сибирский и дальневосточный регионы, в частности, с учетом географического положения территории и интенсивных миграционных потоков. Особенности эпидемического процесса, заключающиеся в проникновении инфекции на новые территории с развитием на отдельных из них (в частности, в Республике Гаити) серьезных эпидемических осложнений, формировании генетически измененных вариантов возбудителя с высоким патогенным и пандемическим потенциалом, определяют холеру как одну из инфекционных угроз XXI века, требующих интегрированного комплексного подхода к решению вопросов профилактики и борьбы с инфекцией.

Интенсивное развитие молекулярных технологий на современном этапе позволяет вывести на новый уровень систему индикации и идентификации патогенных биологических агентов, дает возможность с высокой степенью достоверности устанавливать генетическое родство культур микроорганизмов для выяснения эпидемиологических закономерностей их распространения и реконструкции филогенетических событий в процессе становления новых вариантов патогенов.

С учётом этого диссертационная работа Л.В. Мироновой, цель которой заключается в совершенствовании микробиологического мониторинга и оценке популяционной гетерогенности *V. cholerae* на основе комплексного анализа особенностей структурной организации отдельных локусов генома,

протеомного профиля и механизмов генетической трансформации возбудителя, несомненно, актуальна.

**Научная новизна работы.** Научная новизна и достоверность полученных диссертантом данных не вызывает сомнений. Автором доказана высокая информативность применения ПЦР при исследовании обогащенных проб из объектов окружающей среды в рамках мониторинга вибриофлоры, разработаны методологические основы MALDI-ToF масс-спектрометрического определения таксономической принадлежности микроорганизмов рода *Vibrio*. На основании молекулярно-генетического анализа коллекции штаммов впервые установлен завоз на территорию Сибири и Дальнего Востока атипичных генетически измененных клонов возбудителя холеры Эль Тор с классической аллелью гена субъединицы В холерного токсина и показано распределение указанных вариантов холерного вибриона на две волны распространения холеры. Предложена схема генотипирования измененных клонов *V. cholerae* El Tor по комплексу ассоциированных с патогенностью детерминант (*ctxB*, *rstC*, *rstR*, *tbr*, TLC). С применением комплекса методов молекулярного типирования охарактеризована клональная структура популяций *V. cholerae* в Сибири и на Дальнем Востоке и дана оценка эффективности и значимости применения отдельных методов типирования в эпидемиологическом и 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. При анализе закономерностей обнаружения холерного вибриона в объектах окружающей среды определены «участки риска» поверхностных водоемов на отдельных территориях Сибири и Дальнего Востока, в которых нетоксигенный холерный вибрион обнаруживается на протяжении ряда лет, показана возможность персистенции штаммов *V. cholerae* определенных MLVA-профилей в водных экосистемах с трансформацией генотипа и формированием близкородственных однолокусных вариантов холерного вибриона. Впервые в эксперименте установлена изменчивость генотипа, в частности MLVA- и PFGE-профилей, холерного вибриона при неблагоприятных условиях среды.

**Теоретическая значимость.** Теоретическая значимость проведенного Л.В. Мироновой исследования заключается в установлении молекулярно-

эпидемиологических механизмов развития осложнений по холере на неэндемичных территориях сибирского и дальневосточного регионов, определении вероятных направлений трансформации генома холерного вибриона в процессе персистенции в водных экосистемах региона. Автором определены закономерности адаптационной изменчивости холерного вибриона при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды, заключающиеся либо в обратимой модификации по типу дубликации/амплификации геномных локусов, либо редукции участков генома, а также последовательных фенотипических адаптационных преобразованиях *V. cholerae*. На основании результатов комплексного молекулярно-генетического анализа популяций холерного вибриона в разные эпидемиологические периоды с оценкой разрешающей способности и эпидемиологической согласованности группы методов типирования диссертантом теоретически обоснован дифференцированный подход к их применению в мониторинге холеры.

**Практическая значимость** исследования определяется разработкой, оптимизацией и актуализацией подходов к молекулярно-генетической и протеомной индикации и идентификации, а также к молекулярному типированию возбудителя холеры. Автором в ходе исследования предложена схема генотипирования этиологически значимых 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 микробиологическом мониторинге холеры. Важный практически значимый результат работы – создание и регистрация четырех баз данных, содержащих информацию о биологических свойствах и генотипах штаммов холерного вибриона, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока в период седьмой пандемии, а также депонирование в Государственные коллекции патогенных микроорганизмов и международную базу данных GenBank типовых и уникальных штаммов *V. cholerae* и нуклеотидных последовательностей генов или полных геномов возбудителя холеры.

Результаты работы нашли отражение в трех нормативно-методических документах федерального уровня, пяти – учрежденческого, трех учебно-методических пособиях.

**Обоснованность основных положений и выводов диссертации.** Объем проведенных исследований, дизайн экспериментов, включающий применение классических микробиологических и современных молекулярно-

генетических методов, разносторонний биоинформационный анализ и статистическая обработка полученных результатов свидетельствуют об обоснованности научных положений и достоверности сформулированных автором выводов.

**Оценка содержания диссертации.** Диссертация изложена в традиционном стиле на 357 страницах, состоит из введения, двух глав аналитического обзора литературы, шести глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 428 цитируемых работ, в том числе 109 отечественных и 319 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 41 таблицей и 87 рисунками.

**Во введении** убедительно обоснованы актуальность и основная цель исследования, для достижения которой определено девять задач, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обозначена новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Представленный в диссертации **обзор литературы (главы 1, 2)** свидетельствует о глубоких теоретических познаниях автора по рассматриваемой проблеме. В первой главе обзора проведен анализ ситуации по холере в мире, охарактеризованы основные закономерности эпидпроцесса в современный период, а также подробно рассмотрены особенности генетической организации возбудителя холеры, определяющие высокую мобильность и вариабельность генома и способность к трансформации биологических свойств патогена, что, несомненно, отражается на проявлениях инфекции в мире. Вторая глава обзора литературы посвящена рассмотрению методологических основ различных подходов к молекулярному типированию возбудителя холеры. В результате всестороннего рассмотрения современных литературных данных автором обоснована актуальность, цель и задачи собственного исследования.

**Глава 3** содержит информацию об объемах проведенных исследований и использованных для решения поставленных задач методологических приемах. Значительный объем материала (первичная документация, 690 анализируемых в ПЦР проб из поверхностных водоемов, 1591 исследуемая колония из 3106 проб объектов окружающей среды, выборка из 285 коллекционных штаммов *V. cholerae*, выделенных в разные периоды седьмой пандемии) и широкий круг используемых методов молекулярного анализа свидетельствуют о высоком методическом уровне исследования.

**Глава 4** посвящена характеристике ситуации по холере в России в современный период седьмой пандемии с углубленным анализом проявлений

инфекции в Сибири и на Дальнем Востоке. Автором на основании первичной документации с привлечением литературных данных подробно представлена информация о связанных с завозом возбудителя эпидемических осложнениях по холере в регионе, отдельно рассмотрены зарегистрированные в 1999 г. вспышки холеры на Дальнем Востоке, установлено изменение клинических форм течения инфекции во времени (увеличение удельного веса тяжелых форм холеры в 1990-е гг. в сравнении с 1970-ми гг.) и убедительно показана связь вспышечной заболеваемости холерой на территории с контаминированными холерным вибрионом водоисточниками. По результатам ретроспективного исследования высеваемости *V. cholerae* из объектов окружающей среды диссертантом сделано заключение о существовании «участков риска» водных объектов, где холерные вибрионы обнаруживаются на протяжении ряда лет. Установленные особенности проявлений холеры определяют необходимость совершенствования подходов к мониторингу инфекции с использованием современных молекулярных технологий.

**В главе 5** автором рассмотрены вопросы применения молекулярных технологий в индикации и идентификации возбудителя холеры. В частности, на основании многолетних мониторинговых исследований доказана эффективность использования скрининга генетических детерминант холерного вибриона в обогащенных пробах из объектов окружающей среды, что обеспечивает повышение эпидемиологической эффективности надзора за инфекцией и может быть направлено на оптимизацию объемов бактериологических исследований. В рамках ускоренной идентификации холерного вибриона с учетом требований биологической безопасности разработаны методологические основы прямого белкового профилирования на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии. Проведено формирование базы референсных масс-спектров *V. cholerae*, установлена высокая диагностическая ценность метода, подтвержденная результатами секвенирования таксономически информативных генов, и разработан алгоритм MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации культур в лабораторной диагностике холеры. С учетом полученных результатов автор приходит к выводу, что внедрение указанных подходов обеспечит повышение эффективности микробиологического мониторинга при эпидемиологическом надзоре за холерой.

**В главе 6** представлены результаты амплификационного профилирования штаммов *V. cholerae*, изолированных в сибирском и

дальневосточном регионах. С учетом полученных данных установлена дифференциация холерного вибриона на группы в зависимости от эпидемиологической ситуации с общими для большинства исследованных изолятов видо-, биоваро- и серогруппоспецифическими генетическими маркерами и специфичными для опасных вариантов вибриона Эль Тор мобильными генетическими элементами патогенности и пандемичности. Вместе с тем, в благополучный по холере период в объектах окружающей были идентифицированы единичные изоляты, содержащие ген одного из факторов патогенности – *tcpA*. Интерес представляют данные углубленного исследования детерминант патогенности в геномах штаммов *V. cholerae* периода эпидемических осложнений, по результатам которого автором впервые установлен завоз на территорию Сибири и Дальнего Востока генетически измененных вариантов вибриона Эль Тор, играющих доминирующую роль в этиологии холеры в современный период. Более того, с применением разработанной диссертантом схемы генотипирования установлена гетерогенность завезенных в регион атипичных вибрионов Эль Тор. При этом результаты генотипирования согласуются с направлением завоза возбудителя, что определяет эффективность применения данной схемы в молекулярно-эпидемиологическом анализе. Основываясь на результатах исследования, представлена схема амплификационного профилирования и проведена генетическая паспортизация изолированных в регионе в период седьмой пандемии штаммов холерного вибриона с формированием ГИС-основанной базы данных.

**Глава 7** диссертационного исследования посвящена комплексному молекулярному типированию выделенных в разные эпидемиологические периоды штаммов *V. cholerae* и оценке на основании полученных результатов эффективности отдельных методов типирования при проведении эпидемиологического и филогенетического анализа. С применением мультилокусного анализа варибельных тандемных повторов, пульс-электрофореза, мультилокусного сиквенс-типирования, полногеномного SNP-типирования представлена популяционная структура *V. cholerae* периода эпидемических осложнений, оценена их клональность и установлены молекулярно-эпидемиологические закономерности развития эпидосложнений в сибирском и дальневосточном регионах, которые, по заключению автора, определяются завозом на территорию высокоинфекционных клонов патогена с последующим накоплением возбудителя в поверхностных водоемах и инфицированием людей при

водопользовании. Впервые по результатам филогенетического исследования на основании анализа однонуклеотидных полиморфизмов в полных геномах определена принадлежность завезенных в регион вариантов вибриона Эль Тор к кладам второй и третьей волн глобального распространения холеры.

Особенностью периода благополучия по холере в регионе оказалась высокая генетическая гетерогенность штаммов и установленная на основании данных генотипирования возможность кратковременного или длительного закрепления клонов холерного вибриона на отдельных анализируемых территориях. Представляют интерес данные генотипирования потенциально эпидемически опасных штаммов вибриона Эль Тор, которые, по мнению автора, относятся к отдельной эволюционной линии и могут промежуточным звеном при становлении патогенных клонов холерного вибриона. Сопоставление результатов типирования с эпидемиологическими данными, оценка дискриминирующей способности методов позволила Л.В. Мироновой оценить эффективность применения того или иного подхода к типированию и сформулировать рекомендации по их применению в зависимости от цели исследования.

**В главе 8** представлены данные по изучению стабильности генотипа холерного вибриона в неблагоприятных условиях среды. В процессе эксперимента при воздействии дефицита питательных веществ и разных температурных параметров микросред об установлено изменение не только фенотипических свойств субкультур, но и генетическая трансформация холерного вибриона. Показано статистически значимое превышение частоты изменчивости PFGE-профиля в сравнении с MLVA-генотипом, выявлена более высокая способность к трансформации анализируемых участков генома измененных вариантов вибриона Эль Тор, что согласуется с известной гетерогенностью их генетической организации. Установленные направления и закономерности генетической изменчивости холерного вибриона представляют значительный теоретический и практический интерес, поскольку с одной стороны расширяют понимание молекулярно-генетических механизмов адаптации патогена, а с другой – определяют необходимость учитывать способность к трансформации генотипа *V. cholerae* при интерпретации результатов молекулярного типирования в рамках эпидемиологического надзора за холерой.

**В заключении** диссертации лаконично и емко представлен комплексный анализ полученных результатов исследования в сопоставлении с литературными данными, который позволил автору подойти к

теоретическому обоснованию предложенного усовершенствованного Алгоритма применения молекулярных методов в системе микробиологического мониторинга холеры.

Выводы научно обоснованы, логичны, согласуются с целью и задачами и отражают результаты проведенного исследования.

Основные результаты исследования отражены 65 научных работах, 15 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ, двух коллективных монографиях, трех учебно-методических пособиях. Автореферат информативен, нагляден и отражает основное содержание диссертации.

При рассмотрении работы возник ряд вопросов, в частности:

- существует ли, по мнению автора, вероятность трансформации выделенных из поверхностных водоемов вариантов холерного вибриона биовара Эль Тор, содержащих один из генов патогенности (*tcpA*), в полноценные эпидемически опасные варианты?

- учитывая актуальность внедрения современных технологий в диагностику инфекционных болезней, каковы дальнейшие перспективы использования MALDI-ToF масс-спектрометрии в молекулярной диагностике холеры?

В целом, на основании изложенного можно заключить, что диссертация Л.В. Мироновой выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основе комплексного всестороннего глубокого молекулярно-генетического и молекулярно-эпидемиологического исследования научно обоснованы подходы к совершенствованию микробиологического мониторинга холеры. Представленная работа имеет важное теоретическое значение, содержит новые научные результаты и вносит существенный вклад в практику.

По содержанию и значимости, актуальности и новизне, методологическим подходам, теоретическому и научно-практическому значению результатов диссертационная работа Л.В. Мироновой «Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени



доктора наук, а ее автор, Л.В. Миронова, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Доктор биологических наук, профессор,  
заместитель директора Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Государственный научный центр  
прикладной микробиологии и  
биотехнологии» Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека  
(ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора)



Игорь Георгиевич Шемякин

142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, тел: +7(4967)36-00-60 e-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org) <http://www.obolensk.org>

подпись профессора И.Г. Шемякина, заверяю  
доктор биологических наук, Ученый секретарь  
ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора



Л.В.Коломбет