

## ОТЗЫВ

**на автореферат диссертационной работы Хунхеевой Жанны Юрьевны  
«Молекулярно-генетический анализ популяций микроорганизмов рода *Vibrio*  
в поверхностных водоемах Приморского края»  
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук  
по специальности 1.5.11 – микробиология**

Актуальность представленного исследования чётко поясняется существующими в настоящее время рисками завоза и распространения холеры водным путем на фоне продолжающейся седьмой пандемии, а также рисками возникновения спорадических случаев и вспышек инфекций, вызванных *V. parahaemolyticus*, на территории Приморского края. В этой связи суть работы заключена в совершенствовании мониторинга холеры и пищевых токсикоинфекций (ПТИ) на основе анализа молекулярно-генетических особенностей популяций представителей рода *Vibrio* на территории указанного субъекта Российской Федерации.

Хунхеевой Ж.Ю. была сформулирована конкретная цель и поставлены 4 последовательные задачи диссертационной работы, исходя из которых, была спланирована методология настоящего исследования. Внимание автора сосредоточено на комплексной характеристике и оценке генетического разнообразия популяций обнаруживаемых в ходе мониторинговых исследований объектов окружающей среды (ООС) штаммов *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, а также бактерий вида *V. parahaemolyticus*, в том числе клинических изолятов серотипа O3:K6, несущего основной фактор патогенности парагемолитических вибрионов – гены прямого термостабильного гемолизина – TDH.

Для выявления геномного полиморфизма автором успешно применён современный метод генотипирования – мультилокусный VNTR анализ – MLVA по тандемным повторам в определенном локусе, а также мультилокусное сиквенс-типирование (MLST), что позволило оценить полученные результаты изучения генетического разнообразия микробных популяций в эпидемиологических, филогенетических аспектах. Причем, метод MLVA был использован не только для типирования холерного вибриона холерного вибриона, но и парагемолитического вибриона, что ранее в РФ не проводилось.

Успешная реализация цели и задач исследования позволили автору доказательно обозначить «Научную новизну» работы, представленную в основном оригинальными и приоритетными данными, которые заключалась в том, что были установлены закономерности распространения холерного и парагемолитического вибриона на территории Приморского края, выявлены особенности структурной организации генома этих групп микроорганизмов. На фоне вариабельности штаммов *V. cholerae* по основным и дополнительным генам патогенности, пандемичности и персистенции, в геноме единичных штаммов вибриона выявлены фрагменты «островов пандемичности». Установлено: присутствие «островов патогенности» (VPal-1 – VPal-7) в геномах патогенных изолятов *V. parahaemolyticus*, их клональность, по структуре генов «домашнего хозяйства», определены сиквенс-типы отдельных штаммов, сходных с генотипом штаммов, циркулирующих на территории Китая.

Теоретическая и практическая значимость работы не вызывают сомнения.

Доказана целесообразность применения MLVA при скрининге изолятов *V. cholerae* и при эпидрасследовании случаев ПТИ, вызванных *V. parahaemolyticus*. Получены свидетельства о государственной регистрации базы данных «*V. cholerae*. Сибирь и Дальний Восток – Амплификационный профиль\_MLVA-генотип» и программы для ЭВМ.

Результаты настоящего исследования могут быть интерпретированы как на региональном уровне, так и федеральном уровне, т.к. материалы работы, вошли в МУК 4.2.3745-22 и МУК 4.2.3746-22. На учрежденческом уровне разработаны и утверждены методические рекомендации «VNTR-типирование штаммов *Vibrio parahaemolyticus*».

«Положения, выносимые на защиту» в полной мере согласуются с задачами и полученными выводами проведенного исследования.

Результаты диссертационной работы получены с использованием современного поверенного оборудования, микробиологических, генетических методов исследования с последующей компьютерной статистической обработкой данных с применением методов статистического и биоинформационного анализов. Материалы работы представлены на научно-практических конференциях межгосударственного, всероссийского с международным участием, межрегионального, регионального и институтского уровня.

Работа выполнялась в рамках четырех НИР.

Тема и содержание диссертации соответствуют специальности 1.5.11. – микробиология. Автореферат оформлен в соответствии с необходимыми требованиями и отражает основное содержание работы.

Работа выполнена на 142 штаммах *V. cholerae* и 120 штаммах *V. parahaemolyticus*, выделенных из клинического материала и из поверхностных водоемов в Приморском крае. Дан анализ эпидемиологической ситуации по холере и пищевым токсикоинфекциям галофильной этиологии в указанном регионе. В структуре миграции показано доминирующее значение азиатского направления. В рамках микробиологического мониторинга поверхностных водоемов на наличие возбудителя холеры в Приморском крае с 2011 г. по 2021 г. был выделен 31 штамм *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор, четыре штамма *V. cholerae* R-варианта и 1658 штаммов *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы и 923 штамма *V. parahaemolyticus*. Показаны различия в высеваемости различных видов вибрионов в зависимости от сезонности. Проведен масштабный комплексный анализ фенотипических и генотипических характеристик указанных штаммов. В результате филогенетического анализа было установлено, что у некоторых нетоксигенных *V. cholerae* был обнаружен фрагмент *tpcO183* «острова пандемичности» VSP-I, характерный для эпидемически значимых изолятов. Выявлено 28 ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов, которые не ассоциировались с территориальной и временной приуроченностью.

Идентификация *V. parahaemolyticus* проводилась, в том числе, методом MALDI-ToF-масс-спектрометрического анализа. Методом ПЦР у 13 клинических штаммов, выделенных при вспышках, установлено присутствие гена *tdh* и отсутствие такового у штаммов от единичных больных и из ООС. Кроме того, у *tdh+* штаммов *V. parahaemolyticus* выявлена уникальная рамка считывания *orf8* в составе 237 фага, являющаяся частым маркером пандемичных клонов. Дан анализ дополнительных детерминант патогенности, входящих в состав систем секреции III типа, выявлены отличия патогенных изолятов *V. parahaemolyticus* от непатогенных и водных.



Кластерный анализ MLVA-генотипов штаммов *V. cholerae* определил два клональных комплекса в зависимости от эпидемической значимости с распределением на 89 MLVA-генотипов, из которых 68 – уникальных. Первый сформирован эпидемически опасными штаммами *V. cholerae* O1. Для штаммов из ООС одним MLVA-генотипом было характерно место и время выделения. Показана вариабельность MLVA-профилей нетоксигенных холерных вибрионов.

При MLVA-типировании штаммов *V. parahaemolyticus* установлена высокая генетическая гетерогенность изолятов из объектов внешней среды и относительная консервативность клинических штаммов по анализируемым локусам (Vp2-07, Vptr1, Vptr6, Vptr3, Vptr8, Vptr5). По результатам кластерного анализа клинические *tdh*<sup>+</sup> штаммы парегемолитического вибриона вошли в отдельный кластер. MLST анализ позволил определить у штаммов с генотипом *tdh*<sup>+</sup> два сиквенс-типа ST431 и ST3, который характерен для клональных комплексов пандемичных вариантов *V. parahaemolyticus*, распространенных в мире.

В работе доказательно показана эффективность MLVA-типирования *V. cholerae*: привязка идентичных MLVA-профилей штаммов холерного вибриона O1 серогруппы к периоду и месту их выделения. Установлена возможность изменения количества тандемных повторов в штаммах холерного вибриона под воздействием условий окружающей среды (в локусе VcB у токсигенного штамма и в локусе VcA – у нетоксигенного).

Выявлены закономерности кластеризации генотипов штаммов *V. parahaemolyticus*. Методами MLVA, MLST установлены некоторые закономерности распределения генотипов в плане их сравнительной дифференциации. Показана целесообразность использования MLVA-типирования для дифференциации клинических изолятов.

Пять выводов в полной мере отражают содержание работы.

Автор подчеркивает, что в водных ООС Приморского края преимущественно обнаруживаются *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* O1 и R-вариант, у которых отсутствуют основные детерминанты патогенности. Токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 выявляются в период вспышек и формируют клоны (субклоны). Патогенные варианты парегемолитического вибриона имеют идентичные или сходные MLVA-профили с привязкой к эпидосложнениям.

В итоге работы автор подчеркивает перспективы применения метода MLVA-генотипирования при проведении молекулярно-эпидемиологического анализа при эпидрасследовании случаев обнаружения *V. cholerae* O1 и эпидемических осложнений, обусловленных *V. parahaemolyticus*.

Обращает на себя внимание большой объем проделанной работы с использованием самых современных методов исследования, корректное и наглядное представление полученных данных.

Замечаний по представленному автореферату нет.

Диссертация Хунхеевой Ж.Ю. «Молекулярно-генетический анализ популяций микроорганизмов рода *Vibrio* в поверхностных водоемах Приморского края» по специальности 1.5.11 — микробиология является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой и полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. №7 23, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г.

№ 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. ЛФ 1168, от 20.03.2020 г. № 426, от г. ЛФ 1539, с изм., внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.0.2020 г. №751), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор — заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 — микробиология.

И.о. начальника отдела микробиологии холеры и других кишечных инфекций, главный научный сотрудник Федерального казённого учреждения здравоохранения Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, доктор медицинских наук



Кругликов Владимир Дмитриевич

Подпись Кругликова В.Д.

ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров

Федерального казённого учреждения здравоохранения

Ростовский-на-Дону ордена Трудового

Красного Знамени научно-исследовательский

противочумный институт Федеральной службы

по надзору в сфере защиты прав потребителей

и благополучия человека



Стоян Елена Евгеньевна

Почтовый адрес: ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, Телефон: 8 (863) 240-27-03; E-mail: plague@aaanet.ru