

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Чекрыгиной Елены Владимировны «МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ И ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ, КОМПЛЕКСНОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПАТОГЕНОВ ТЕРРИТОРИИ» представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования

Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения – одно из ключевых направлений работы здравоохранения. В целях развития проактивной и устойчивой системы защиты населения от санитарно-эпидемиологических угроз утвержден и выполняется федеральный проект «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» в которого создана сеть высокотехнологичных центров секвенирования, ПЦР-тестирования, проводится разработка тестов для быстрой диагностики инфекционных заболеваний. Для успешной реализации поставленных задач с помощью приемов молекулярной диагностики необходимо создание баз данных о генетических вариантах патогенных микроорганизмов, циркулирующих в отдельных регионах. Эта информация необходима для повышения эффективности молекулярно-эпидемиологического анализа при расследовании отдельных случаев и вспышек инфекционных заболеваний, установления фактов заноса возбудителей. В Ставропольском крае значительную долю в структуре инфекционной заболеваемости занимают острые кишечные и воздушно-капельные инфекции потенциальную угрозу представляют туляремия, лихорадка Ку, Крымская геморрагическая лихорадка. Непрерывный молекулярно-генетический мониторинг циркуляции возбудителей, актуальных для Ставропольского края, ранее не проводился, а исследования носили отрывочный, не системный характер. Не оценивалась эпидемиологическая значимость отдельных генетических вариантов возбудителей характерных для территории региона. Ставропольский край в силу его высокой значимости в качестве рекреационного центра страны, и большой миграции населения требует особого внимания при реализации мер по профилактике инфекционных болезней.

Поэтому цель исследования, сформулированная как «комплексное молекулярно-генетическое типирование возбудителей природно-очаговых и острых кишечных инфекционных болезней, циркулирующих на территории Ставропольского края, анализ выявленных геновариантов», актуальна и своевременна.

*Восходящий № 5/1-600-30
от 25.03.2024г.*

Поставленная цель достигнута путем формулировки и последовательного решения пяти задач исследования.

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

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России в рамках НИР «Молекулярно-генетический анализ возбудителей инфекционных болезней в системе обеспечения эпидемиологической безопасности (на примере Ставропольского края)» (Рег. № НИР: АААА-А17-11710134045-9). Исследования одобрены Этическим комитетом ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России (выписка из протокола заседания № 59 от 17.11.2016). Лабораторные исследования проведены на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в 2016–2022 гг. в рамках договоров о сотрудничестве ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России и ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора №335/16 от 01.11.2016, №11 от 23.10.2017, договора о сотрудничестве от 20.06.2019.

Все исследования осуществлялись на современном лабораторном оборудовании, прошедшем метрологическую поверку. Исследования осуществлялись с применением микробиологического, молекулярно-генетического методов, статистического, геоинформационного и биоинформационного анализов. Наличие специфической ДНК/РНК возбудителей в образцах полевого и клинического материала подтверждали с использованием зарегистрированных отечественных диагностических тест-систем или протоколов, описанных в научной литературе.

Анализ нуклеиновых кислот изолятов *Rickettsia sp.*, боррелий, вируса ККГЛ, ортохантавирусов, вируса Западного Нила, ротавирусов, норовирусов, энтеровирусов проводили путем фрагментарного секвенирования соответствующих фрагментов генома.

3. Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность результатов работы подтверждена достаточной репрезентативностью выборки образцов для исследования: 350 штаммов и изолятов нуклеиновых кислот возбудителей природно-очаговых инфекций, 154 штамма и образцов нуклеиновых кислот возбудителей ОКИ, длительным сроком наблюдений (материал забран в период с 2016 по 2022 гг.), использованием методов исследования, позволяющих выполнить поставленные задачи. Пробы полевого материала, содержащие целевую ДНК/РНК для проведения молекулярно-генетического типирования, получены при проведении лабораторного

исследования образцов, собранных на территории Ставропольского края в рамках планового эпизоотологического мониторинга за циркуляцией возбудителей ПОИ в 2016–2022 гг. Пробы клинического материала содержащие РНК вируса ККГЛ и ДНК *S. burnetii*, получены из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае». Штаммы *S. Enteritidis* и образцы суспензий фекалий от больных ОКИ получены из бактериологических лабораторий лечебно-профилактических учреждений региона. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев оценивали в программе Mega 11. Для обработки результатов использовали широкий набор программ включая Vector NTI, PHYLOVIZ 2.0, CanSNPer2, Newbler assembler v 3.0. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев проверяли с помощью Bootstrap анализа, вычисления проводили для 1000 повторов. Картографический анализ выполняли в программе ArcMap 10.

На защиту вынесены четыре положения. Все положения подтверждены фактическим материалом, представленным в диссертации.

Первое положение подтверждено результатами молекулярно-генетического профилирования и установлением циркуляции на территории Ставропольского края *F. tularensis*, *S. enterica*, микрорганизмов рода *Borrelia*, *S. burnetii*, вирусов ККГЛ, ЛЗН, риккетсий, ротавирусов, норовирусов, энтеровирусов. Второе положение касается разной эпидемиологической значимости выявленных патогенов, при этом наибольшую угрозу представляют все выявленные варианты вируса ККГЛ, возбудителя туляремии, отдельные MLVA-типы *S. Enteritidis*, геноварианты рота-, норо- и энтеровирусов. Третье положение констатирует факт впервые установленной циркуляции ортохантавирусов на территории юга европейской части России. Четвертое положение подводит итог проведенной работы и констатирует, что накопленные данные о распространении отдельных генетических вариантов возбудителей ПОИ и ОКИ в Ставропольском крае могут быть использованы при эпидемиологическом анализе вспышек и спорадических случаев инфекций, а также мониторинге популяций возбудителей.

Семь выводов обоснованы фактическим материалом, подтверждают положения, выносимые на защиту. Первое положение подтверждено выводами 1, 2 и 4; второе – выводом 5, третье положение – выводом 3, четвертое – выводами 6 и 7.

Полученные данные о генетических профилях патогенов использованы при проведении эпидемиологического расследования вспышек инфекционных болезней. Молекулярное типирование штаммов *F. tularensis*, выделенных при расследовании вспышек в 2017 и 2022 гг., позволило установить связь вспышки с сезонной эпизоотией среди грызунов и с многократными случаями контаминации воды.

Молекулярное типирование вируса ККГЛ при расследовании летального случая КГЛ в 2022 г. показало, что случай заболевания вызван вирусом генотипа Европа-1, характерным для территории Ставропольского края, при этом подобные штаммы ранее вызывали случаи заболевания, протекающие в средне-тяжелой и тяжелой формах.

4. Практическая значимость результатов.

В результате проведенной работы получены данные о генетических особенностях штаммов возбудителей ПОИ и ОКИ, с применением геоинформационных систем локализованы места их выделения в Ставропольском крае. Создана и зарегистрирована база данных «Генетические варианты возбудителей ОКИ и ПОИ, выявленные в Ставропольском крае в 2016–2021 гг.», разработаны методические рекомендации «Геномное профилирование ПБА отдельных регионов (на примере Ставропольского края)» (учрежденческий уровень внедрения). Материалы исследования используются при чтении лекций на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России в рамках преподавания дисциплин «Общая микробиология», «Микробиология», «Вирусология».

По итогам проделанной работы автором сформулированы практические рекомендации о целесообразности осуществления систематического молекулярно-генетического мониторинга за циркуляцией геновариантов возбудителей инфекционных болезней, актуальных для субъектов РФ с составлением баз данных геномных профилей при эпидемиологическом расследовании вспышек и спорадических случаев инфекционных заболеваний. Определен перечень возбудителей для проведения систематического геномного мониторинга. Также приведен набор методик и структура апробированных автором праймеров для углубленной генетической характеристики включая проведение фрагментарного и полногеномного секвенирования.

Вызывает интерес раздел о перспективах продолжения исследований направленных на дальнейшее совершенствование системы молекулярно-генетического мониторинга за возбудителями инфекционных болезней. На взгляд автора для рутинной идентификации патогенов перспективным является внедрение в практику методов высокопроизводительного секвенирования, метагеномного секвенирования, разработка стандартизированных протоколов биоинформатической обработки результатов. Также необходима разработка *on-line* платформ для автоматизированной обработки нуклеотидных последовательностей и визуализации результатов молекулярно-генетических исследований.

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

Работа изложена по традиционному плану на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка источников литературы, включающего 191 источник, в т.ч. 99 отечественных и 92 зарубежных авторов. Работа содержит 14 таблиц, 22 рисунка, содержит 1 приложение.

Автореферат изложен на 23 страницах, иллюстрирован семью рисунками и двумя таблицами. Его содержание информативно, кратко и полностью отражает содержание диссертации, научную новизну, практическую значимость, положения, выносимые на защиту. Очень убедительно представлены данные картографического анализа.

Работа написана понятным языком, хорошо иллюстрирована.

Замечаний по тексту диссертации и автореферата нет.

6. Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы. Полнота опубликования результатов.

Автор принимал участие в выполнении лабораторных исследований образцов полевого и клинического материала на наличие нуклеиновых кислот возбудителей, выполнил молекулярно-генетические исследования, анализ и интерпретацию полученных результатов, сформулировал выводы и основные положения, выносимые на защиту. Часть исследования проведена в соавторстве с биологом лаборатории диагностики бактериальных инфекций отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Гнусаревой О.А. и с младшим научным сотрудником лаборатории диагностики бактериальных инфекций отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Зайцевой О.А. которым автор выразил благодарность.

Результаты исследования представлены и обсуждены на шести научных конференциях различного уровня в период 2017-2022 годов и отражены в 13 научных публикациях. В трех журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», диссертант является первым автором. Опубликованные работы полностью отражают положения, выносимые на защиту, и выводы.

Заключение

По актуальности, новизне, достоверности полученных результатов, обоснованности сделанных выводов, научной и практической значимости диссертация Чекрыгиной Елены Владимировны «МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ И ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ, КОМПЛЕКСНОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПАТОГЕНОВ ТЕРРИТОРИЙ», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, обладает внутренним единством.

Диссертация отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в ред. Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. №723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168, от 20.03.2020 г. №426 с изменениями внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 г. №751, от 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024 №62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Чекрыгина Елена Владимировна заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.11.- Микробиология.

Официальный оппонент

Доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории диагностики холеры и других острых кишечных инфекций 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

Сергей Олегович Водопьянов 

Адрес: 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, тел.: 8 (863) 240-27-03,
E-mail: plague@aaanet.ru

Подпись Сергея Олеговича Водопьянова заверяю
Ученый секретарь ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора



Полеева Марина Владимировна



«24» марта 2024 г.