

ОТЗЫВ  
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА  
на диссертацию Хунхеевой Жанны Юрьевны  
**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ  
МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO* В ПОВЕРХНОСТНЫХ  
ВОДОЕМАХ ПРИМОРСКОГО КРАЯ»,**  
представленную на соискание степени кандидата медицинских наук по  
специальности 1.5.11. Микробиология

**Актуальность темы диссертации**

Мониторинг эпидемиологической обстановки по холере продолжает оставаться одной из приоритетных задач по стратегии борьбы с данным инфекционным заболеванием. Активные торгово-экономические и туристические взаимосвязи России со странами, неблагополучными по холере, определяют возможность завоза инфекции в субъекты Российской Федерации. Приморский край в силу географического расположения и наличия разнообразных транспортных связей является территорией с высоким риском заноса и распространения холеры. Климатические условия Приморского края оптимальны для накопления и размножения возбудителя холеры в случае его попадания в поверхностные водоемы. Другой проблемой Приморского края является широкое распространение *V. parahaemolyticus*, который также имеет клиническое значение. Все изложенное определяет актуальность изучения микроорганизмов рода *Vibrio* на генетическом уровне. Это позволит оценить эффективность микробиологического мониторинга при проведении исследований спорадических и групповых случаев заболеваний, в рамках совершенствования эпидемиологического надзора за холерой и другими патогенными вибрионами.



### Содержание диссертации, ее завершенность.

Представленная диссертационная работа является законченным исследованием, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Диссертация изложена на 183 страницах, содержит 37 таблиц и иллюстрирована 35 рисунками. Список литературы включает 288 наименований, из них 202 на иностранных языках.

Цель исследования: оценка генетического разнообразия популяций микроорганизмов рода *Vibrio* в Приморском крае для совершенствования микробиологического мониторинга холеры и инфекций, вызванных параземолитическим вибрионом.

Для достижения цели были сформулированы 4 задачи.

Во введении приведено обоснование актуальности исследования, сформулированы цель и задачи, показана новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены основные положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о степени достоверности, апробации работы и публикациях, а также о структуре и месте выполнения диссертации, методологии и методах исследования.

Обзор литературы состоит из трех разделов. Первый раздел посвящен ситуации по холере и пищевым токсикоинфекциям, обусловленным параземолитическим вибрионом, на глобальном и региональном уровнях. В данном разделе на основе данных научной литературы автор показывает значимость *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus* в инфекционной патологии и их широкое распространение в поверхностных водоемах как в мировом масштабе, так и в пределах Приморского края. Во втором разделе рассмотрены факторы патогенности представителей рода *Vibrio*. Третий раздел содержит описание молекулярно-генетических методов типирования возбудителей



холеры и пищевых токсикоинфекций, обусловленных парагемолитическим вибрионом.

В главе «Материалы и методы» автор представляет методические приемы исследований. Достоверность научных положений подтверждается достаточным объемом выполненных исследований и их статистической обработкой. Автором использованы как классические микробиологические и биохимические, так и современные молекулярно-биологические, биоинформационные и статистические методы исследований.

Результаты, полученные автором, содержатся в 3 - 6 главах.

Глава 3 посвящена анализу ситуации по холере и пищевым токсикоинфекциям галофильной этиологии на территории Приморского края. Глава состоит из четырех разделов. В первом разделе автор очень подробно оценивает риски завоза холеры на территорию Приморского края автомобильным, авиационным, морским и железнодорожным транспортом. Для этого был проведен анализ миграционных потоков за 2015 – 2021 гг. и установлено, что в структуре въездной миграции доминирующее значение принадлежит пассажирам из стран, где регистрируются случаи заболеваемости холерой.

В следующем разделе данной главы был проведен анализ результатов мониторинга вибриофлоры в период с 2011 г. по 2021 г. в поверхностных водоемах Приморского края. Продемонстрировано широкое распространение *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор и *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы. Это свидетельствует о возможности выживания и накопления возбудителя холеры в случае его завоза в регион.

Третий раздел посвящен анализу заболеваемости пищевыми токсикоинфекциями (ПТИ), обусловленными парагемолитическим вибрионом. Учитывая географическое положение Приморского края, ПТИ галофильной этиологии приобретают на территории края важное значение. Для этого был проведен ретроспективный анализ заболеваемости ПТИ за период с 1997 г. по 2021 г. и анализ заболеваемости острыми кишечными



инфекциями. Установлено, что случаи заболевания ПТИ, вызванных галофильными микроорганизмами, регистрировались на протяжении всего анализируемого периода с подъемом заболеваемости в летне-осенний период. При анализе факторов передачи установлена значимая роль в развитии ПТИ морепродуктов, таких как креветки, крабы, моллюски и т.д.

В раздел 3.4 автор проводит анализ закономерностей выявления параземолитического вибриона в поверхностных водоемах Приморского края. Данный микроорганизм является естественным обитателем прибрежных преимущественно морских водоемов. Показано, что *V. parahaemolyticus* были изолированы на протяжении всех лет исследования. Максимальный пик его высеваемости установлен в сентябре.

Таким образом, в Приморском крае существует высокий риск завоза возбудителя из стран, неблагополучных по холере. В то же время в самом регионе есть благоприятные условия для его сохранения в поверхностных водоемах.

В главе 4 представлены фенотипические и молекулярно-генетические свойства микроорганизмов рода *Vibrio*, обнаруживаемых в поверхностных водоемах Приморского края. Указывается, что штаммы *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*, выделенные на территории Приморского края, характеризуются преимущественно типичными фенотипическими свойствами. Молекулярно-генетический анализ показал высокую вариабельность вариантов холерного вибриона по исследуемым детерминантам патогенности (*ctxA*, *tcpA*, *rtxA* *rtxC*, *hapA*, *ompU*), видоспецифичности (*hlyA*, *toxR*), принадлежности к O1 и O139 серогруппам (*wbeT*, *wbfR*), пандемичности (*tnpO183*, *proO490*) и персистенции (*mshA*, *mshQ*, *vpsR*). Молекулярно-генетический анализ *V. parahaemolyticus* показал присутствие всех или почти всех известных «островов патогенности» у патогенных изолятов, а у непатогенных и водных выявлено наличие только одного интактного «острова патогенности» VPal-6, играющего роль в биопленкообразовании.



В главе 5 показаны результаты молекулярного типирования холерного и парагемолитического вибрионов, выделенных в Приморском крае. Автор делает вывод, что штаммы холерного вибриона, выделенные из поверхностных водоемов Приморского края на фоне эпидемиологического благополучия, обладают высокой вариабельностью генома по наличию и количеству тандемных повторов в отличие от эпидемически опасных штаммов. Гетерогенность популяций может быть обусловлена как возможным воздействием факторов окружающей среды, ведущим к структурным изменениям генома с образованием близкородственных клонов, так и изменчивостью профилей в процессе пассажа и хранения культур на питательных средах.

MLVA-типирование штаммов парагемолитического вибриона, выделенных из различных источников, также свидетельствует о гетерогенности его популяции.

Мультилокусное сиквенс-типирование на основании анализа структуры генов «домашнего хозяйства» парагемолитического вибриона позволило сделать вывод о принадлежности выделенных в Приморском крае патогенных изолятов *V. parahaemolyticus* к ST431 и ST3 к глобально распространенному клональному комплексу CC3. Для непатогенных изолятов, выделенных как от больных при единичных случаях заболевания, так и из поверхностных водоемов, установлена высокая вариабельность структуры генома по результатам анализа генов «домашнего хозяйства».

Глава 6 посвящена оценке эффективности использования метода мультилокусного анализа вариабельных тандемных повторов (MLVA) в типировании холерного и парагемолитического вибрионов при проведении микробиологического мониторинга. Установлено, что данный метод обеспечивает дифференциацию клинических изолятов с высокой дискриминирующей способностью, согласующуюся с эпидемиологическими данными и может быть рекомендован для эпидемиологического



расследования вспышек ПТИ, вызванных патогеном, как в рамках оперативного, так и ретроспективного анализа.

В разделе «Заключение» автор обобщает и анализирует полученные результаты, сопоставляя их с данными литературы последних лет.

Диссертация заканчивается 6 выводами, которые полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы.

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

Научные положения работы, сформулированные в диссертации, базируются на использовании современных методов и достаточном объеме статистически обработанных данных, которые соответствуют поставленной цели и отражают решение поставленных задач.

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на научных конференциях различного уровня. По теме диссертационной работы опубликовано 16 работ, из них 5 в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ», одна – в зарубежной печати. Материалы, представленные в работе, вошли в нормативные документы федерального уровня.

**Новизна исследования, значимость для науки и практики полученных автором результатов.**

Теоретическая проработка проблемы, отраженная в литературном обзоре, а также применение комплексных современных аналитических и статистических методов, позволили автору получить результаты, обладающие научной новизной, которая заключается в оценке закономерностей распространения холерного и параземолитического вибрионов в поверхностных водоемах Приморского края. Автором выявлены особенности структурной организации генома выделенных в Приморском крае штаммов холерного вибриона в отношении основных и дополнительных генов патогенности, пандемичности и персистенции. Установлено присутствие



полного набора исследуемых «островов патогенности» в геномах патогенных изолятов *V. parahaemolyticus*, в то время как непатогенные клинические и водные штаммы демонстрируют вариабельность по наличию и структуре «островов патогенности». Полученные результаты указывают на перспективность применения MLVA типирования при расследовании групповых случаев заболеваний, вызванных *V. parahaemolyticus*. Установлена принадлежность патогенных клинических штаммов *V. parahaemolyticus* к клональному комплексу СС3, широко распространенному в мире. Сравнительный анализ глобального распространения сиквенс-типов *V. parahaemolyticus* показал, что некоторые из них относятся к пандемичному клональному комплексу, выявленному у парагемолитического вибриона, циркулирующего на территории Китая.

Автореферат диссертации составлен в соответствии с требованиями ГОСТ Р7.0.11-2011. Содержание автореферата достаточно полно раскрывает сущность проблемы и отражает основные положения диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Однако, по прочтении диссертации возникли следующие **вопросы и замечания**:

1. Таблицы 1 и 2, 3 и 4 логичнее было бы объединить (пример, таблица 5);
2. Зачем нужно было делать настолько подробный анализ миграционных потоков? В чем смысл анализа внутригодовой динамики миграционных потоков по отдельным видам транспорта?
3. Рис. 14 лучше было назвать «Количество выделенных штаммов *V. cholerae* из поверхностных водоемов...»
4. Рис 15 и 16 дублируют друг друга
5. График 19 не несет необходимой информации
6. С какими факторами патогенности связан регулятор ToxR
7. На рисунке 23, вероятно, вместо wbfR написан wbrF

**Заключение.** Диссертационная работа Хунхеевой Жанны Юрьевны на



тему: «Молекулярно-генетический анализ популяций микроорганизмов рода *Vibrio* в поверхностных водоемах Приморского края», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11. Микробиология, является законченной научной квалификационной работой, в которой содержится оценка генетического разнообразия популяций микроорганизмов рода *Vibrio* в Приморском крае для совершенствования микробиологического мониторинга холеры и инфекций, вызванных параземолитическим вибрионом.

По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11. Микробиология.

**Официальный оппонент:**

**Маркова Юлия Александровна**, доктор биологических наук (03.02.03 - микробиология), заведующий лаборатории растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, СИФИБР СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Телефон: +7(3952) 42-67-21; Факс: +7(3952) 51-07-54

e-mail: [juliam06@mail.ru](mailto:juliam06@mail.ru)

Сайт: <http://www.sifibr.irk.ru/>

Подпись Марковой Ю.А. заверяю  
Ученый секретарь СИФИБР СО РАН,

К.Б.Н.  2023 г.



Т.В. Копытина