

## Отзыв официального оппонента

Доктора биологических наук, доцента, главного научного сотрудника лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации Хохловой Ольги Евгеньевны на диссертационную работу Киреевой Александры Геннадьевны на тему: «Генетические детерминанты патогенности штаммов стрептококков групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

### Актуальность темы диссертационного исследования

В настоящее время многие представители р. *Streptococcus* являются клинически значимыми возбудителями различных инфекционных заболеваний человека. При этом, у человека тяжелые инвазивные инфекции чаще всего вызывают *Streptococcus pyogenes* (стрептококки группы А), *Streptococcus agalactiae* (стрептококки группы В), *Streptococcus pneumoniae*. Также представляет интерес изучение видов *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* (стрептококки групп С и G), так как в последние годы отмечается рост заболеваемости, обусловленной данными видами микроорганизмов. Важно дать характеристику эпидемиологической картины распространенности различных генетических вариантов *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, циркулирующих на территории Юго-Восточной Азии, сравнить с клональной структурой штаммов стрептококков групп А, С и G, выделенных в Российской Федерации; охарактеризовать устойчивость изучаемых штаммов стрептококков к антимикробным химиопрепаратам и детерминирующие их генетические маркеры, а также генетические маркеры патогенности. Научная работа Киреевой Александры Геннадьевны посвящена изучению генетических детерминант патогенности штаммов стрептококков групп А, С и

G, циркулирующих на территории Вьетнама и является своевременной и актуальной.

Цель и задачи исследования обоснованы и направлены на изучение молекулярно-генетических особенностей штаммов стрептококков серологических групп А, С и G, циркулирующих среди детей младшего школьного возраста во Вьетнаме, в том числе выявление клональной структуры и степени генетической гетерогенности стрептококков, характеристике генетических детерминант устойчивости стрептококков групп А, С и G к антимикробным химиопрепаратам, и оценке их эпидемического потенциала.

### **Научная новизна**

Киреевой Александрой Геннадьевной впервые дана характеристика видового состава и клональной структуры штаммов стрептококков групп А, С и G, циркулирующих на территории Вьетнама, получены новые данные, позволяющие выявить эпидемическую значимость данных патогенов. Автором установлена взаимосвязь высокого уровня устойчивости к макролидам, у штаммов *S. pyogenes*, циркулирующих во Вьетнаме с появлением нового генотипа *emm12* с cMLS типом устойчивости к антимикробным химиопрепаратам. Проведенное полногеномное секвенирование и аннотирование генома штамма *S. pyogenes* генотипа *emm12*, выделенного во Вьетнаме, позволило выявить филогенетическую связь с эпидемическим клоном, вызвавшим вспышку скарлатины в Китае и Гонконге. Генетические детерминанты устойчивости к макролидам, линкозамидам и стептограмину В среди штаммов CGC и CGG, участвуют в распространении путем конъюгативного переноса. Методом анализа результатов полногеномного секвенирования трех штаммов *S. dysgalactiae* subspecies *equisimilis* выявлены новые мобильные генетические элементы устойчивости к тетрациклину, эритромицину и линкозамидам.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций**

Выносимые на защиту научные положения, заключения, выводы и практические рекомендации, сформулированные автором в диссертации, основаны на получении достаточного объема материала результатов экспериментальных и теоретических исследований коллекции штаммов штаммов стрептококков групп А, С и G, выделенных на территории Вьетнама. В диссертационном исследовании использованы современные методы исследования, которые полностью соответствуют поставленным задачам. Результаты работы получены с использованием современного поверенного оборудования и методов статистической обработки. Выводы диссертации отражают суть выполненной работы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В результате выполнения работы Киреевой А.Г. получен ряд фундаментальных результатов теоретического характера, описывающих анализ генетической структуры популяции стрептококков групп А, С и G, циркулирующих среди детей во Вьетнаме. В частности, автором обнаружены новые мигрирующие генетические элементы, содержащие гены устойчивости к тетрациклину, макролидам и линкозамидам, что может положить основу для исследований, направленных на оценку распространённости данных детерминант в глобальном масштабе. Обнаружены новые генетические маркеры наиболее вирулентных штаммов стрептококков. Депонированы в международную базу данных GenBank полногеномные последовательности штаммов *S. pyogenes* V31 (GenBank Acc. № GCA\_014050235.1), *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* B82 (GenBank Acc. № GCA\_016888305.1), V123 (GenBank Acc. № GCA\_016888325.1), NT15 (GenBank Acc. № GCA\_016888365.1). Пополнена коллекция микроорганизмов ФГБНУ «Института экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург) и Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой). Предложенные протоколы биоинформатического анализа результатов полногеномного секвенирования используются сотрудниками лаборатории инновационных

методов микробиологического мониторинга НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» для выявления у штаммов бактерий мобильных элементов значимых с позиции распространения антибиотикорезистентности.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал личное участие в поиске и анализе литературных источников по теме исследования, определении цели и задач исследования, планировании и проведении эксперимента, обработке полученных результатов. Часть экспериментальных исследований выполнялась совместно со специалистами ФБУН «СПб НИИЭМ им. Пастера», ФГБНУ «ИЭМ».

### **Публикации и апробация результатов диссертации**

Все изложенные в диссертации результаты опубликованы в рецензируемых изданиях. Всего по теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 публикации в рецензируемых изданиях, 1 публикация в других изданиях, 10 публикаций в материалах конференций. Результаты были доложены и обсуждены на многочисленных всероссийских и международных конференциях. Таким образом, количество публикаций и апробация результатов соответствует требованиям ВАК к кандидатским диссертациям.

### **Структура и содержание работы**

Диссертация Киреевой А.Г. включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список литературы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста и иллюстрированы 18 таблицами, 21 рисунком. Список литературы включает 210 источников, из них 9 – отечественных, 201 – зарубежных.

В разделе «Введение» автор дает обоснование темы представленной на рассмотрение работы, формулирует цель и задачи работы, указывает новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, определяет выносимые на защиту положения, описывает методологию исследования, личный вклад, а также приводит сведения о публикациях и апробации на конференциях.

В главе «Обзор литературы» Александра Геннадьевна приводит достаточно современные данные по изучаемой проблеме, используя, в том числе в качестве источников работы, опубликованные в 2021 и 2022 годах. В данном разделе представлена информация о характеристике представителей р. *Streptococcus*, молекулярно-эпидемических подходах для внутривидовой дифференциации штаммов стрептококков, генетическом полиморфизме стрептококков, уровне устойчивости микроорганизмов к антимикробным химиопрепаратам.

В главе «Материалы и методы» автором описаны объекты исследования, методики культивирования бактериальных клеток, их идентификации, оценки антибиотикочувствительности. Представлены использованные в работе молекулярно-генетические методы исследования, включая ПЦР, *emt*-генотипирование, электрофорез в пульсирующем электрическом поле, секвенирование по Сэнгеру, полногеномное секвенирование, методы биоинформационного анализа.

Результаты собственных исследований состоят из нескольких ключевых частей, логично связанных по смыслу между собой и соответствующих поставленным задачам. В Главе 3 «Создание коллекции штаммов стрептококков и их первичная характеристика» описаны результаты изучения 132 штаммов стрептококков групп А, С и G, выделенных в 2012-2014 гг. от детей младшего школьного возраста (7-10 лет) во время экспедиций в различные регионы Вьетнама; клинических изолятов СГА генотипов *emt1* (47 штаммов) и *emt12* (38 штаммов) из коллекции ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», выделенных в Санкт-Петербурге и Пекине

(Китай) от детей школьного возраста, больных скарлатиной, гнойным синуситом, тонзиллитом, а также носителей; 34 штамма СГА различных типов из коллекции ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, выделенных в 2008-2011 гг. при инвазивных инфекциях мягких тканей в отделении гнойной хирургии 23 ГКБ им. «Медсантруд» (Москва).

В Главе 4 «Установление генетического родства штаммов стрептококков с помощью методов молекулярной генетики» представлены результаты *emm* – генотипирования, анализа рестрикционного полиморфизма хромосомной ДНК штаммов стрептококков методом пульс-электрофореза штаммов стрептококков, выделенных во Вьетнаме.

В Главе 5 «Определение уровня устойчивости штаммов СГА, СГС и СГГ к антибактериальным препаратам» описаны фенотипы антибиотикорезистентности изученных штаммов и тип лекарственной устойчивости. Определены уровни минимальной подавляющей концентрации эритромицина у штаммов *S. pyogenes*.

В Главе 6 «Выявление мобильных генетических элементов, ассоциированных с генами вирулентности и антибиотикоустойчивости, у штаммов СГА» представлены генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов СГА; результаты полногеномного секвенирования штамма СГА *emm12* генотипа; сравнительный анализ штаммов СГА, выделенных в Юго-Восточной Азии и России, по наличию генов, ассоциированных с мобильными генетическими элементами; результаты ПЦР скрининга штаммов *S. pyogenes*.

В Главе 7 «Выявление мобильных генетических элементов, ассоциированных с генами вирулентности и антибиотикоустойчивости, у штаммов СГС и СГГ» охарактеризованы генетические детерминанты антибиотикоустойчивости у штаммов СГС и СГГ, описаны новые мобильные генетические элементы, содержащие гены антибиотикоустойчивости, у трех

вьетнамских штаммов *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*, обнаруженные с помощью полногеномного секвенирования.

Заключение основывается на всех полученных результатах и соответствует поставленной цели и задачам.

Выводы представлены кратко, соответствуют задачам и отражают проведенный объем работы.

Практические рекомендации ориентированы для микробиологических лабораторий, а также эпидемиологов и клиницистов, занимающихся терапией и профилактикой инфекций, вызванных стрептококками групп А, С и G.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

#### **Соответствие диссертационного исследование специальности 1.5.11 – микробиология**

Объект изучения, поставленные цель и задачи исследования, применяемые методы и экспериментальные подходы, результаты, выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют паспорту специальности 1.5.11 – микробиология, в частности: 3. Биологическое разнообразие микроорганизмов, включая разнообразие типов энергетического обмена и источников углерода, 11. – Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ, 12. – Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.

#### **Вопросы и замечания по диссертационной работе**

Диссертационная работа представляет законченное, самостоятельное исследование и вносит значительный вклад в изучении патогенных и условно-патогенных стрептококков групп А, С и G, их молекулярно-генетических особенностях. Рецензируемая работа написана понятно и хорошим языком, есть некоторые опечатки в тексте диссертации.

1. В названии диссертационного исследования автором акцентировано внимание на генетических детерминантах патогенности штаммов

стрептококков групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме, однако в научной новизне и выводах более представлены данные о генетических маркерах антибиотикорезистентности и клональной структуре штаммов. Чем это можно объяснить?

2. Автором в работе представлены результаты генотипирования штаммов стрептококков групп А, С и G методами *emt*-генотипирования и электрофореза в пульсирующем электрическом поле. Обоснуйте возможность использования MLST-, cgMLST-, wgMLST- и других современных методов типирования при изучении клональной структуры стрептококков групп А, С и G?
3. Возможно-ли и планирует-ли автор в дальнейшем разработку мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для видовой идентификации стрептококков групп А, С и G с одновременным определением генов устойчивости к антимикробным химиопрепаратам?

Сделанные замечания и вопросы не носят принципиального характера, не снижают научной и практической ценности выполненных исследований и не вызывают сомнения в достоверности и значимости основных положений и выводов диссертации.

### **Заключение**

Диссертационная работа Киреевой Александры Геннадьевны на тему: «Генетические детерминанты патогенности штаммов стрептококков групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой разработаны теоретические положения о клональной структуре стрептококков групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме, их эпидемической значимости, детерминантах патогенности и антибиотикорезистентности. Совокупность представленных положений можно квалифицировать как решение актуальной задачи в микробиологии, и в области изучения стрептококков групп А, С и G, в частности.



Диссертационная работа Киреевой Александры Геннадьевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723, 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. №1168, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, от 26.01.2023 г. №101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. №1768 и от 25.2024 г. №62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Киреева Александра Геннадьевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

#### **Официальный оппонент**

Главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии

Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Доктор биологических наук

(03.02.03 - микробиология), доцент  Хохлова Ольга Евгеньевна

Подпись официального оппонента Хохловой О.Е. заверяю

Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ИМБ

Доктор биологических наук

«16» мая 2024 г.

 Коломбет Любовь Васильевна

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279

E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org), [hohlova@obolensk.org](mailto:hohlova@obolensk.org)

+7 (4967) 36-00-03