

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, доцента Соловьевой Ирины Владленовны на диссертационную работу Киреевой Александры Геннадьевны на тему «ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ СТРЕПТОКОККОВ ГРУПП А, С И G, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВО ВЬЕТНАМЕ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11 – «микробиология»

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Эпидемиологическая ситуация, связанная с распространением стрептококковой инфекции в мире остается напряженной. Стрептококки группы А (СГА) являются одними из основных патогенов человека и одной из ведущих причин заболеваемости и смертности. Все большую роль в тяжелых инфекционных заболеваниях человека бактериальной природы также стали играть представители стрептококков серологических групп С и G, в частности *S. anginosus*, *S. dysgalactiae* и *S. constellatus*, которые имеют большое сходство с СГА, вследствие чего их часто называют пиогенноподобными. Они могут как обнаруживаться в составе микробиоты верхних дыхательных путей, кожи и влажных складок здоровых лиц, так и приводить к развитию тяжелых инфекционных заболеваний человека, таких как хронический тонзиллит, импетиго, эндокардиты, септические артриты, менингит, абсцессы и др. Поэтому исследования генетических особенностей штаммов стрептококков серологических групп А, С и G не утратили своей актуальности и являются предметом пристального внимания со стороны научного сообщества и врачей различных специальностей, в том числе эпидемиологов.

В последнее десятилетие в странах Азиатского региона увеличилось число заболеваний скарлатиной, обусловленной штаммами *S. pyogenes* с множественной лекарственной устойчивостью. Согласно современным представлениям, гены антибиотикорезистентности зачастую расположены на мобильных генетических элементах, что способствует формированию и распространению устойчивости к антимикробным препаратам.

Изучение структуры эпидемических клонов возбудителей стрептококковых инфекций, изучение механизмов возникновения и распространения антибиотикорезистентности являются актуальными задачами микробиологии и эпидемиологии.

Таким образом, не вызывает сомнения актуальность диссертационной работы Киреевой А.Г., посвященной изучению генетического разнообразия и распространенности

генотипов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью штаммов стрептококков групп А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме.

**Степень новизны исследования, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

На основе результатов молекулярно-генетического мониторинга Киреевой А.Г. впервые охарактеризован видовой состав и клональная структура штаммов стрептококков А, С и G, циркулирующих во Вьетнаме. Установлено, что появление нового клона *emm12* генотипа с *mLS* типом лекарственной устойчивости обусловило высокий уровень резистентности СГА к макролидам. Показано генетическое родство между штаммом *S.pyogenes emm12* генотипа, циркулирующим во Вьетнаме, и эпидемическими штаммами, циркулирующими в Китае и Гонконге. Доказана ключевая роль конъюгативного переноса в распространении устойчивости стрептококков серогрупп С и G к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В. Обнаружены новые мобильные генетические элементы, обеспечивающие устойчивость к тетрациклину, эритромицину и линкозамидам, у штаммов *S. dysgalactiae subspecies equisimilis* – NT15 и V123 (серогруппа G) и B82 (серогруппа С), циркулирующих в разных провинциях Вьетнама.

**Теоретическая и практическая значимость результатов**

Результаты диссертационного исследования Киреевой А.Г. имеют существенное теоретическое и практическое значение. Теоретическая (фундаментальная) значимость работы заключается в том, что автором внесен весомый вклад в понимание молекулярных основ генетической изменчивости и эволюции стрептококков. Получены новые знания о генетическом разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам. Доказано, что распространение генотипов популяции стрептококков в глобальном масштабе неравномерно, что может быть связано с особенностями климата, уровнем урбанизации и развития здравоохранения. Установлены связи между лекарственной устойчивостью и принадлежностью штаммов СГА к определенным генотипам, что необходимо для оценки их эпидемического потенциала и клинического значения.

Практическая значимость полученных результатов заключается в возможности применения предложенного алгоритма генотипирования штаммов и быстрого выявления основных генотипов для характеристики особенностей структуры популяции стрептококков, ассоциированных со вспышками скарлатины в Юго-Восточной Азии. Данный алгоритм может быть взят на вооружение службами эпидемиологического

надзора в Российской Федерации. Депонирование полногеномных последовательностей нескольких изолятов *S. dysgalactiae* и *S. pyogenes* играет важную роль в области распространения и обмена научной информацией. Сформированная коллекция штаммов стрептококков различных видов, выделенных во Вьетнаме, может быть использована для исследования особенностей геномики стрептококков и выявления генов, имеющих отношение к формированию патогенного фенотипа бактерий. Это позволит выявить новые мишени для идентификации эпидемических штаммов.

### **Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность результатов диссертационной работы Киреевой А.Г. обоснована достаточным количеством исследованных штаммов стрептококков групп А, С и G (251 штамм), использованием адекватного задачам комплекса современных лабораторных методов (включая полногеномное секвенирование) и обработкой полученных данных с применением специализированного программного обеспечения и международных web-платформ.

Результаты диссертационной работы Киреевой А.Г. представлены и обсуждены на 10 научно-практических конференциях международного и всероссийского уровня. Диссертантом опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 публикации в рецензируемых изданиях.

### **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Диссертационная работа Киреевой А.Г. оформлена в соответствии с требованиями ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Она изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 рисунком и содержит 18 таблиц.

В разделе «**Введение**» представлена актуальность проблемы, выбранной для проведения исследований, степень разработанности темы, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, определены цель и задачи работы. В ходе подготовки диссертации использованы современные, рациональные, апробированные и эффективные методы исследований. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту и обоснована их достоверность. Диссертант принимал активное участие во всех этапах работы, в том числе в составлении плана исследований, экспедициях для сбора

микробиологического материала, выполнении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, анализе, биоинформатической обработке и оценке полученных результатов.

В первой главе «Обзор литературы» Киреевой А.Г. проанализировано 210 отечественных и иностранных источников (9 отечественных и 201 иностранный). Автором представлены данные о представителях рода *Streptococcus* и вызываемых ими инфекциях, существующих методах молекулярно-генетического типирования в системе эпидемиологического надзора, данные о распространении штаммов стрептококков с лекарственной устойчивостью возбудителя с акцентом на генетическую изменчивость и эволюцию. Обзор дает полное представление не только об актуальности темы, но и раскрывает нерешенные вопросы в области подходов к унификации критериев классификации и оценки клинико-эпидемиологической значимости генотипов *S. pyogenes*, в том числе ассоциированных с лекарственной устойчивостью возбудителя.

В главе 2 «Материалы и методы» показан объем исследования и подробно описаны все используемые методы, соответствующие поставленным целям и задачам диссертационной работы. В работе использованы как классические микробиологические, так и современные молекулярно-генетические и биоинформатические методы исследования, сочетание которых позволяет получать достоверные результаты.

Раздел «Результаты собственных исследований» состоит из пяти самостоятельных глав. В третьей главе дана характеристика выделенных штаммов. Показано, что уровень обсемененности верхних дыхательных путей стрептококками серологических групп А, С и G у детей во Вьетнаме составляет 9,7%, при этом условно-патогенные стрептококки серогрупп С и G встречаются в 1,5 раза чаще патогенных стрептококков группы А. Описаны ускоренные способы определения видовой принадлежности штаммов стрептококков на основе ПЦР. В результате проведенной работы создана коллекция штаммов для проведения дальнейших исследований.

В четвертой главе представлены результаты работы по внутривидовому молекулярно-генетическому типированию штаммов стрептококков и определению их генетического родства с использованием методов *emt*-генотипирования и анализа рестрикционного полиморфизма геномной ДНК методом пульс-электрофореза (PFGE). Метод *emt*-генотипирования позволил выявить генотипы стрептококков, доминирующие на территории разных провинций Вьетнама, а использование метода PFGE показало родство этих штаммов с эпидемическими штаммами, циркулирующими на территории Китая и Гонконга.

**В пятой главе** представлен анализ фенотипической устойчивости штаммов стрептококков различных видов к основным группам лекарственных препаратов, определены типы их лекарственной устойчивости и установлена минимальная подавляющая концентрация эритромицина для штаммов *S. pyogenes*.

**В шестой главе** описаны генетические детерминанты устойчивости к антибиотикам штаммов стрептококков серологической группы А, представлены результаты и биоинформатический анализ полного генома штамма *S. pyogenes* V31 *emm12* генотипа, который отнесен к эпидемической клональной линии, быстро распространяющейся у людей. Приведен ПЦР скрининг азиатских и российских штаммов стрептококков группы А на наличие генов, входящих в состав *ICE-emm12* и на наличие генов вирулентности, ассоциированных с профагами. Установлено, что все исследованные штаммы содержат как интегрированные линейные формы *ICE*, так и циклическую форму, способную к горизонтальному переносу, а штаммы, выделенные в Юго-Восточной Азии, сильно отличаются по профилю фаговых генов от штаммов, выделенных в России.

**В седьмой главе** представлены результаты изучения генетических детерминант антибиотикорезистентности штаммов стрептококков *S. dysgalactiae subspecies equisimilis*, серологических групп С и G и показана ключевая роль конъюгативного переноса в распространении устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В и описаны новые мобильные генетические элементы, обеспечивающие их устойчивость к тетрациклину, эритромицину и линкозамидам.

В разделах «**Обсуждение результатов**» и «**Заключение**» проанализированы полученные результаты, дана их оценка с использованием сведений научной литературы и подчеркнуты их научная новизна.

**Выводы** полностью соответствуют цели и задачам диссертации, убедительно аргументированы и подтверждены достоверными данными, полученными в результате исследования.

В разделе «**Практические рекомендации**» сформулированы основные предложения, которые могут представлять интерес для научного сообщества, специалистов практического здравоохранения и Роспотребнадзора. Использование дополнительных генетических маркеров позволяет более быстро и эффективно выявлять эпидемические клоны возбудителя и вести эпидемиологический надзор за инфекциями, вызываемыми стрептококками серологических групп А, С и G.

**Автореферат** диссертационного исследования А.Г. Киреевой соответствует тексту диссертации и отражает основное содержание и результаты работы. Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям ГОСТ 7.0.11-2011.

### **Замечания по диссертационной работе**

В процессе ознакомления с диссертацией возникли следующие вопросы и замечания:

1. В разделе Материалы и методы не указаны условия инкубации штаммов *Streptococcus spp.*
2. В разделе Материалы и методы при описании оценки антибиотикочувствительности штаммов необходимо было сослаться не только на МУК 4.12.1890-04, но и на Клинические рекомендации МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2021 год.
3. В таблице 12 на странице 84 «МПК эритромицина штаммов СГА» указаны МПК эритромицина, определенные с помощью метода микроразведений, и данные о чувствительности штаммов к тетрациклину, определенные с использованием диско-диффузионного метода. Это некорректно, так как таблицы должны объединять однородные данные.
4. Зачем был взят в работу антибактериальный препарат «Энрофлоксацин», показанный для использования в ветеринарии?
5. Какую программу использовали для анализа паттернов PFGE?

### **Соответствие специальности**

Диссертационное исследование А.Г. Киреевой полностью соответствует научной специальности 1.5.11 – Микробиология (биологические науки), а именно пунктам паспорта специальности: 2. Эволюция микроорганизмов, 11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ, 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности.

### **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 законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований в области молекулярно-генетического мониторинга охарактеризована популяция стрептококков серогрупп А, С и G во Вьетнаме в условиях широкого распространения устойчивости возбудителей к лекарственным препаратам. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Киреевой Александры Геннадьевны полностью отвечает требованиям пунктов 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842

от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 26.05.2020 №751, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 №415 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Киреева Александра Геннадьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

**Официальный оппонент:**

Доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник – заведующая лабораторией микробиома человека и средств его коррекции Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.академика И.Н.Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Соловьева Ирина Владленовна

28.05.2024

Адрес: 603950, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, д. 71

8(831) 432-81-86

E-mail: lab-lb@yandex.ru

**Подпись Соловьевой Ирины Владленовны заверяю:**

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.академика И.Н.Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.б.н.

Снегирева Мария Сергеевна

Адрес: 603950, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, д. 71

8(831) 469-79-01

E-mail: micro@nniiem.ru

