

ФМБА РОССИИ

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Детский научно-клинический
центр инфекционных болезней
Федерального
медико-биологического агентства»
(ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России)
адрес: 197022, Санкт-Петербург
ул. Профессора Попова, д.9
тел. (812) 234-60-04 факс (812) 234-9691
e-mail: niidi@niidi.ru; nii_detinf@fmbamail.ru
ОКПО 01966495, ОГРН 1037828009548
ИНН/КПП 7813045265 / 781301001
29.05.2024 № 01.21/491

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Детский научно-клинический центр
инфекционных болезней»
Федерального медико-
биологического агентства
Член-корреспондент РАН
Профессор доктор медицинских наук



К.В. Жданов

2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» 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

Стрептококковые инфекции имеют высокую социально-экономическую значимость и являются проблемой здравоохранения, как в развитых, так и в развивающихся странах. Особо актуальны инфекции, вызванные штаммами стрептококков с множественной устойчивостью к антимикробным химиопрепаратам. Актуальность стрептококков группы А возросла с 2023 г, когда во многих странах начали регистрировать резкий подъем частоты как легких, так и крайне тяжелых инфекций. Зафиксировано появление и распространение генетической линии M_{1UK} с повышенной вирулентностью

Совершенствование методов молекулярной диагностики, особенно методов молекулярного типирования, привели к новым представлениям о передаче и распространении стрептококков различных видов. В разных странах отмечено распространение разных генетических клонов возбудителей инфекционных заболеваний, поэтому крайне актуальным является исследование клональной принадлежности стрептококков, циркулирующих на территории Юго-Восточной Азии и РФ, и изучение особенностей структурной организации их геномов, факторов вирулентности и механизмах их регуляции в ответ на среду пребывания, а также выявление механизмов резистентности к антимикробным химиопрепаратам. Эти данные важны для разработки эффективной стратегии лечения и прогноза формирования резистентности в будущем.

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

Оценено современное состояние уровня носительства стрептококков различных видов среди детей младшего школьного возраста во Вьетнаме. Охарактеризована клональная структура штаммов *Streptococcus pyogenes*, выявлена их связь с российскими и глобальными клонами. Оценена эпидемическая значимость выделенных штаммов для территории Юго-Восточной Азии и РФ. Получены сведения о генетическом профиле вирулентности и механизмах антибиотикорезистентности штаммов стрептококков, выделенных от здоровых носителей. Обнаружены новые мигрирующие элементы в составе хромосомной ДНК, содержащие гены, обеспечивающие устойчивость микроорганизмов к неблагоприятным условиям внешней среды и усиливающие его вирулентные свойства.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Представленный в работе экспериментально-практический материал является теоретической основой для совершенствования доступных методик

выявления клональной принадлежности и изучения эволюции возбудителей инфекционных заболеваний человека. Практическая значимость полученных результатов заключается в выявлении молекулярных мишеней, которые могут быть использованы для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, вызванных стрептококками. Создана уникальная коллекция штаммов стрептококков различных видов, в том числе штаммов, которые могут быть использованы как контрольные на международном уровне. Полученная научная информация о структуре геномов штаммов *S. pyogenes*, и *S. dysgalactiae* позволяет отслеживать эволюцию возбудителей широкого спектра местных, генерализованных и системных заболеваний человека, распространенных во всем мире. Полные последовательности геномов включены в базу данных GeneBank.

Результаты диссертационного исследования были успешно внедрены в практическую деятельность отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» и 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.

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

Диссертационная работа основана на значительном объеме экспериментальных исследований и полученных результатов, проведением исследований на сертифицированном оборудовании с использованием методов исследования, соответствующих современным требованиям и общемировым стандартам с высоким уровнем чувствительности, объективности, а также использование программного обеспечения,

необходимого для проведения биоинформационного анализа экспериментальных данных.

Основные положения работы были доложены и обсуждены на 10 российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук».

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Материалы диссертационной работы изложены на 140 страницах машинописного текста и иллюстрированы 18 таблицами, 21 рисунком, упрощающими восприятие материала.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и библиографического указателя, насчитывающего 210 источников научной литературы, из которых 9 – отечественных и 201 – зарубежных авторов.

В разделе «Введение» охарактеризована актуальность темы, обозначены цель и задачи исследования. Поставленные задачи реальны и выполнимы. Диссертант обозначила научную новизну и вынесла основные положения диссертации.

В обзоре литературы представлен анализ опубликованных трудов отечественных и зарубежных ученых по вопросам носительства и роли различных видов стрептококков в развитии инфекционных заболеваний, диагностики и лечения инфекций, вызванных данными микроорганизмами, определения клональной принадлежности, изучения молекулярно-

генетических особенностей возбудителей и исследования структуры их геномов.

В материалах и методах приведён перечень использованного оборудования и реактивов, описаны методики работы с культурами микроорганизмов, анализа морфологических свойств штаммов, выделения нуклеиновых кислот, проведения ПЦР и PFGE, оценки чувствительности штаммов к антибактериальным химиопрепаратам, фрагментного и полногеномного секвенирования, приведены программы, использованные для биоинформационного анализа экспериментальных данных.

В главе 3 представлены результаты выявления частоты встречаемости стрептококков различных серологических групп, среди практически здоровых детей во Вьетнаме. Уровень носительства стрептококков серологических групп А, С и G от числа обследованных составил 9,7 % среди школьников начальных классов. Полученные данные согласуются с ситуацией по распространенности внебольничных штаммов стрептококков среди здоровых жителей в других регионах мира. При помощи 16S РНК типирования и ПЦР с видоспецифичными праймерами на гены *srn60* и *rnpB* проведен анализ видового состава СГС/СГГ в верхних дыхательных путях вьетнамских детей и обнаружены представители трех филогенетических групп: *anginosus*, *mitis*, *pyogenes*.

В главе 4 представлена молекулярно-генетическая характеристика популяции стрептококков, циркулирующих среди детей младшего школьного возраста во Вьетнаме. Выявлено большое разнообразие в перечне встречающихся *emm* типов и профилей PFGE. При этом среди штаммов *S.pyogenes* 28% штаммов относились к одной клональной линии с *emm12* генотипом и одинаковым профилем PFGE и антибиотикоустойчивости.

В главе 5 представлен анализ устойчивости штаммов стрептококков различных видов к основным лекарственным препаратам. Штаммы

характеризовались высоким уровнем устойчивости к макролидам, тетрациклину, аминогликозидам и фторхинолонам. Все штаммы были чувствительны к ампициллину, цефалоспорином III-IV поколения и ванкомицину.

В главах 6 и 7 были установлены основные детерминанты, обеспечивающие устойчивость штаммов стрептококков групп А, С и G к макролидам, линкозамидам и тетрациклину. Расположение генов, ассоциированных с антибиотикорезистентностью, на мобильных генетических элементах способствует высокой вероятности горизонтального переноса и распространению глобальной резистентности. У штаммов *Streptococcus pyogenes* доминантного *emm12* генотипа обнаружены уникальные особенности структуры генома, дающие штаммам избирательное преимущество. Высокий уровень вирулентности и антибиотикорезистентности данного генетического варианта был ассоциирован с присутствием ICE-*emm12* с генами устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограммину В и тетрациклину, бактериофага ФНКУ.vir с уникальной мозаичной структурой и множеством факторов вирулентности, наличия большой инверсии. Полученные данные позволяют идентифицировать новые молекулы-мишени для дифференциации изолятов и выявления эпидемических клонов. Проведено сопоставление генетических вариантов и эволюции *Streptococcus pyogenes*, распространенных во Вьетнаме со штаммами, распространенными в России и за рубежом. Штаммы, относящиеся к выявленному в данном исследовании основному *emm12* генотипу, оказались широко распространены в странах Юго-Восточной Азии и были ассоциированы со вспышками скарлатины. В России был идентифицирован лишь один штамм, относящийся к данной генетической линии и содержащий в своем геноме ICE-*emm12* и ФНКУ.vir.

Установлено, что высокий уровень резистентности штаммов СГС и СGG к макролидам и линкозамидам и тетрациклину во Вьетнаме

преимущественно связан с конъюгативным переносом мобильных генетических элементов, содержащих гены антибиотикоустойчивости, а не клональной экспансии устойчивых штаммов. Обнаружение в геноме условно-патогенных стрептококков групп С и G многочисленных детерминант и новых мобильных элементов, ассоциированных с устойчивостью к антибиотическим препаратам важно как с позиции повышенного уровня вирулентности штаммов, так и с позиции эволюционных изменений, происходящих в популяции.

Заключение посвящено обобщению полученных результатов исследования, формулированию итога проделанной работы и описанию перспектив для последующих исследований возбудителей стрептококковых заболеваний. Выводы, приведённые в диссертации, вытекают из представленных автором экспериментальным данным, являются обоснованными, полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Соответствие специальности.

Диссертационное исследование Киреевой Александры Геннадьевны соответствует следующим областям паспорта специальности 1.5.11. -

Микробиология:

1. Систематика и филогения микроорганизмов.
2. Эволюция микроорганизмов.
11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ.
12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности

В процессе ознакомления с диссертацией возникло несколько замечаний и вопросов:

1. Для оценки антибиотикочувствительности автор использовала рекомендации МУК 4.12.1890-04. Следует отметить, что данный документ во многом устарел. В настоящее время в Российской Федерации принято

руководствоваться ежегодно обновляемыми рекомендациями, подготовленными на основе рекомендаций Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам и одобренными Профильной комиссией по клинической микробиологии и антимикробной резистентности.

2. Хотелось бы узнать мнение автора о причинах высокой частоты устойчивости стрептококков к фторхинолонам. В качестве пожелания следует указать на целесообразность расшифровки механизмов устойчивости к этим препаратам.
3. Хотелось бы получить комментарии автора по Рис. 12. Обычно при iMLS_B фенотипе D-зона наблюдается и вокруг диска с клиндамицином, на рисунке этого не видно.

Приведенные замечания не оказывают принципиального влияния на общую положительную оценку диссертационной работы

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 содержится решение важной научно-практической задачи – даны фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристики популяции стрептококков во Вьетнаме в условиях широкого распространения устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к лекарственным препаратам.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, практической значимости, диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 30.07.2014г. №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, от 25.01.2024 г. №62, 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.

Отзыв на диссертационную работу Киреевой А.Г. был заслушан, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (протокол № 5 от 29.05.24 г.).

Заведующий научно-исследовательским отделом
медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии
ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Федерального медико-биологического агентства»

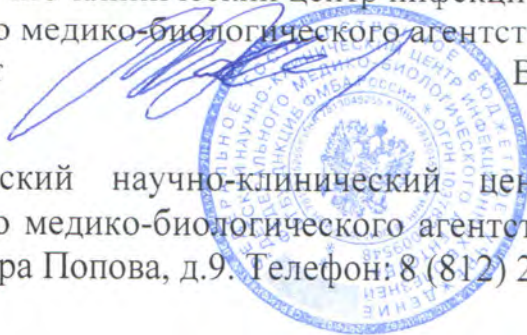
Член-корреспондент РАН,
д.м.н., профессор



Сидоренко Сергей Владимирович

Подпись д.м.н. Сидоренко С.В. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ
«Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Федерального медико-биологического агентства»
к.м.н., доцент



Волжанин Валерий Михайлович

ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Федерального медико-биологического агентства», 197022, Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, д.9. Телефон: 8 (812) 234-17-71 e-mail: niidi@niidi.ru