

О Т З Ы В

официального оппонента Савельевой И.В на диссертационную работу
Замарина Антона Александровича «Детекция и молекулярное типирование
интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах
Vibrio cholerae различных серогрупп», представленную на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук по специальности

03.02.03 – микробиология

Работа выполнена в ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора в рамках двух государственных
тем: № 079-4-13 «Идентификация специфичных маркеров для
характеристики и генетической паспортизации штаммов *Vibrio cholerae* с
множественной устойчивостью к антибиотикам». 01.2013 –12.2015 гг. (№
гос. Регистрации 01201351987) и № 182-4-16 «Молекулярные основы
перsistенции, эпидемического и патогенетического потенциала холерных
вибрионов различного происхождения» (раздел 4), 03.2016 –2018 гг. (№ гос.
регистрации АААА-А16-116070610105-60).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 5 глав
собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы (146
цитированных работ, в том числе 16 отечественных и 130 зарубежных
авторов). Работа изложена на 99 страницах компьютерного текста, включает
17 таблиц и 13 рисунков.

Актуальность темы диссертационного исследования

На современном этапе течения седьмой пандемии холеры, начавшейся в
1961 г. на о. Сулавеси (Индонезия), актуальными являются исследования,
направленные на изучение молекулярно-генетических структур,
ответственных не только за токсигенность и эпидемичность,
обнаруживаемых в геноме холерных вибрионов при мониторинге за

возбудителем холерной инфекции в объектах окружающей среды и в биологическом материале от человека, но и генетических структур, ответственных за резистентность к антибактериальным препаратам и способствующих распространению генов лекарственной устойчивости в микробной популяции.

В свете сказанного, сформулированная соискателем цель работы: «анализ распространения и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации», в связи с широким распространением антибиотикорезистентных штаммов возбудителя холеры, является обоснованной и актуальной.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, репрезентативность эмперического материала.

Автором определены актуальность, цель, методология и алгоритм исследования, проведен сбор данных научной литературы по разрабатываемой проблеме. Лично или при его непосредственном участии спланированы и выполнены молекулярно-генетические исследования методом полимеразной цепной реакции, проведен анализ и интерпретация статистически обработанных результатов, подчеркивая их репрезентативность.

Научная новизна полученных результатов исследования и выводов, сформулированных в диссертации.

Анализ материалов диссертации Замарина А.А. позволяет прийти к заключению, что работа, несомненно, обладает научной новизной.

Анализируя данные современной научной литературы, автор акцентирует внимание читателя на следующих положениях:

- седьмая пандемия холеры продолжается, оставаясь серьезной проблемой здравоохранения в мире. Важной закономерностью эпидемического процесса холеры является способность этиологического агента сохраняться и накапливаться в объектах окружающей среды, что обусловлено высокой

пластичностью за счет наличия в геноме возбудителя большого количества мобильных генетических элементов с локализованными в них генами патогенности, персистенции, пандемичности и полиантибиотикорезистенции к препаратам, применяемых для лечения больных холерой;

- проблема множественной лекарственной устойчивости приобретает все большую актуальность для штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп в плане выявления фенотипов холерных вибрионов с такими свойствами и путей формирования устойчивости возбудителя холеры к антибактериальным препаратам;
- с появлением в 90-е годы прошлого столетия генетически измененных *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, которые в последние два десятилетия текущего столетия полностью вытеснили типичный токсигенный холерный вибрион данного биовара, вызвавшего седьмую пандемию, проблема множественной лекарственной устойчивости возбудителя холеры приобрела особую актуальность. В процессе эволюции геноварианты *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор приобрели интегративные конъюгативные элементы (ICE), которые входят в детально изученное семейство SXT/R391 с генами, кодирующие антибиотикорезистенность у штаммов возбудителя холеры.

Решение задач, направленных на достижение цели диссертационной работы, позволили автору получить новые данные о наличии в геноме *V. cholerae* различных серогрупп интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391, несущие гены, кодирующие полирезистентность к антибактериальным препаратам. Учитывая не идентичность ICE семейства SXT/R391, но кодирующих высоко гомологичную интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ Int, автор использовал в качестве мишени для поиска SXT элемента последовательность гена интегразы *int_{sxt}* в геномах исследуемых штаммов холерных вибрионов. Для детекции последовательности гена интегразы использованы две пары праймеров: SXT-F/ SXT-B (GenBank) и INT-1/ INT-2 (Hochhut B. et al., 2000).

Амплификация последовательности гена интегразы *int* с вышеназванными праймерами показала наличие данной последовательности у 25 из 108 исследованных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы. Скрининг штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 и штаммов *Vibrio spp.* и не относящихся к виду *V. cholerae* на наличие гена интегразы *int* с праймерами SXT-F/ SXT-B выявил 40 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 из 66, выделенных в 2013 г. и 25 штаммов *Vibrio spp.* из 38, выделенных также в 2013 г., несли данную генетическую структуру. Из 46 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных в 2014 г., SXT положительными оказались 18. Практически около 50% штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных из проб воды поверхностных водоемов в Волгоградской области в своем геноме содержали ICE семейства SXT/R391.

Углубляя свои исследования, автор провел молекулярное типирование ICE семейства SXT/R391 путем анализа структуры локусов вариабельной ДНК, несущих детерминанты резистентности к антибактериальным препаратам. С этой целью использован набор олигонуклеотидов, специфичных гену устойчивости к сульфометаксазолу (*sulII*), гену устойчивости к стрептомицину (*strB*), детерминантам устойчивости к триметоприму – дегидрофолатредуктазам *dfr18* и *dfrA1*, характерных для вариантов SXT^{MO10} и SXT^{EL}, соответственно, и гену устойчивости к канамицину (*kan*). Для типирования SXT элемента в ПЦР использовали праймеры из GenBank (*sulII-F/ sulII-R; dfr18-F/ dfr18-R; dfrA1-F/ dfrA1-R; so26-F/ so27-R* и *strB-F/ strB-R* (Iwanaga M. et al., 2004)). Амплификация мишений с названными праймерами проведена в монолокусном формате на амплификаторе C1000 (BioRad).

В результате молекулярного типирования штаммов *V. cholerae* различных серогрупп в ПЦР с праймерами, специфичными последовостям SXT элемента, выявлено пять типов ICE элементов, обозначенных как ICE VchRus0 (SXT не содержит кластер антибиотикорезистенции); ICE VchRus1 (SXT^{EL} содержит кластер устойчивости к сульфометаксазолу –*sulII*

и к стрептомицину – *strB*); VchRus3 (SXT^{EL} содержит кластер устойчивости к канамицину – *kan*; ICE VchRus4/ ICE VchRus4 SXT^{HYB}, содержащие кластер устойчивости к канамицину, соответственно, у штаммов SXT^{EL} и SXT^{MO10}.

В геномах штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 определено три типа ICE: SXT^{MO10} (*dfr18*), SXT^{MO10} (*strB*, *dfr18*) и SXT (ΔR).

Следует отметить, что впервые проведен анализ молекулярных структур вариабельных последовательностей горячих точек HS3, HS5 и вариабельного региона VRIII ICE штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации, что позволило более детально характеризовать антибиотикоустойчивые штаммы холерных вибрионов различных серогрупп.

Так, например, штаммы *V. cholera* O1 El Tor, содержат типичный SXT^{EL} с кластером генов антибиотикорезистентности *sulII*- *strB*- *dfrA1*- *kan*. При этом ген *kan* оказался локализованным вне кластера устойчивости и был обнаружен в интрагенном пространстве горячей точки HS5.

Анализ вариабельного региона VRIII ICE штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 показал наличие интегрированного в локусе *rumB* кластера резистентности с частичными делециями. В этом локусе идентифицированы два варианта состава кластера резистенции: с одним геном устойчивости к триметоприму (*dfr18*) и с детерминантами устойчивости к стрептомицину (*strB*) и триметапрому (*dfr18*).

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны и обоснованы методические приемы и аналитические алгоритмы выявления и типирования антибиотикореистентных штаммов *V. cholerae* различных серогрупп по наличию или отсутствия в их геноме интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391, несущих гены, кодирующие лекарственную резистентность у бактерий. Данная разработка используется для паспортизации и углубленного изучения молекулярно-генетических свойств штаммов холерного вибриона различных серогрупп в лабораториях ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский

противочумный институт Роспотребнадзора (справка о внедрении №02-12/419 от 05.04.2018 г.).

Депонирование штаммов *V. cholerae* El Tor 19243 и *V. cholerae* non O1/non O139, содержащие различные типы интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в Государственную коллекцию патогенных бактерий ФКУЗ «Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора (штаммам присвоены номера *V. cholerae* КМ 2025 и *V. cholerae* non O1/non O139 КМ 2026, соответственно), также свидетельствует о практической направленности докторской диссертации.

Степень достоверности результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением бактериологических и молекулярно-генетических методов с последующим анализом полученных данных.

Выводы обоснованы фактическим экспериментальным материалом, соответствуют полученным результатам, отражают задачи исследования.

В целом докторская диссертация и автореферат написаны литературным языком, хорошо иллюстрированы. Отдельные неточности орфографического характера не изменяют достоинств работы. Положения, выносимые на защиту, выводы докторской диссертации конкретны и полностью отражают результаты проведенных исследований. В автореферате изложены основные положения докторской диссертации, а материалы самой докторской диссертации достаточно полно отражены в 4 опубликованных работах, 2 из которых – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России.

Заключение.

Докторская диссертация Антона Александровича Замарина «Детекция и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп»,

выполнена на актуальную тему, является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, имеющей научную ценность и практическую направленность, содержащей новое решение научной задачи, имеющей существенное значение в решении проблемы антибиотикорезистенции холерных вибрионов различных серогрупп, соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842, предъявляемым к диссертационным работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, а автор диссертации Замарин А.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по заявленной специальности.

Врач-бактериолог Научно- производственной лаборатории препаратов для диагностики ОИ и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
кандидат медицинских наук,
Савельева Ирина Вилориевна
355035, г. Ставрополь, ул. Советская 13-15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора, телефон 8-(865-2)-26-03-12;
E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Savel'eva

И.В. Савельева

Подпись Савельевой И.В. заверяю.

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Ставропольский противочумный
институт Роспотребнадзора

В.В. Демченко



28.08.2018