

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Замарина Антона Александровича**
«Детекция и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов
семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп»
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Множественная лекарственная устойчивость микроорганизмов представляет общую серьезную проблему для здравоохранения в отношении возбудителей многих инфекционных заболеваний, в том числе и *V. cholerae*. Появление устойчивых к антибиотикам холерных вибрионов существенно снижает эффективность лечения как типичной холеры, так и холероподобных диарей, вызываемых соответственно токсигенными и нетоксигенными штаммами различных серогрупп. Последние зачастую циркулируют в поверхностных водоемах и в настоящее время признаны резервуарами генов, определяющих не только патогенетический потенциал возбудителей, но и их антибиотикорезистентность. Возможность формирования штаммов с расширенными «наборами» детерминант устойчивости за счет горизонтального переноса в первую очередь связана с локализацией многих из них на мобильных элементах, в частности, интегративных конъюгативных элементах (ICE). ICEs различаются по качественному и количественному составу генов резистентности и могут приобретать новые гены в дополнение к уже имеющимся благодаря наличию «горячих точек» интеграции. Генетический обмен может происходить не только между штаммами *V. cholerae*, но также между представителями близкородственных видов. Все эти процессы изучены недостаточно, в особенности в отношении «отечественного» резервуара генов антибиотикоустойчивости в природных популяциях вибрионов, а также структуры ICEs, интегрированных в их геномы, тогда как такие данные необходимы с точки зрения и фундаментальной науки, и практического применения. Поэтому представленная к защите диссертационная работа, несомненно, актуальна.

Цель работы состояла в анализе распространенности и молекулярном типировании интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* разных серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации.

В соответствии с целью автором поставлены 5 задач, которые успешно решены в процессе выполнения работы.

Научная новизна представленных в диссертации результатов заключается в получении приоритетных данных о наличии ICEs в штаммах *V. cholerae* разных серогрупп, выделенных на территории РФ, установлении присутствия определенных генов антибиотикорезистентности в их вариабельном регионе VRIII и горячих точках HS3, HS5, проведении скрининга штаммов *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области, на наличие ICE.

Практическая значимость работы состоит в разработке методических приемов и аналитических алгоритмов молекулярной характеристики ICEs, которые на сегодняшний день используются для углубленного изучения свойств штаммов холерных вибрионов разных серогрупп и их паспортизации в Волгоградском противочумном институте и в дальнейшем могут быть внедрены в работу других институтов. В Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» депонированы 2 штамма *V.cholerae* O1 и nonO1/nonO139, содержащие различные типы ICE, которые могут быть использованы в качестве эталонных в сравнительном анализе.

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 99 страницах и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований (включая главу с описанием материалов и методов), заключения и выводов, проиллюстрирована 13 рисунками и 17 таблицами. Список использованных источников литературы включает 146 публикаций (16 отечественных и 130 зарубежных).

Во **введении** убедительно показана актуальность проблемы, а также приведена основная информация по результатам диссертационного исследования. Пять положений, выносимых на защиту, отражают основные результаты и достижения работы.

В **обзоре литературы** рассматриваются данные о структуре генома холерных вибрионов и интегрированных в него мобильных элементах. Особое внимание автор уделил ICEs, приведя подробную информацию о структуре их консервативных и вариабельных участков, горячих точках и регионах VR, способах горизонтальной передачи и возможных путях эволюции. На наш взгляд, разделы об истории открытия холерных вибрионов и эпидемий холеры можно было без ущерба для содержания сократить либо вовсе опустить, т.к. эти сведения хорошо известны специалистам.

В **главе 2 – Материалы и методы** приведен перечень взятых в работу штаммов холерных и других вибрионов с указанием их происхождения, а также описание метода ПЦР. По всей видимости, в эту главу более логично было бы включить последовательности использованных праймеров и условия реакции, приведенные в последующих главах (табл. 5-7 и 10-14).

Антон Александрович начал собственные исследования с детекции ICEs в геномах большой группы штаммов, выделенных в РФ, что нашло отражение в **главе 3**. Факт присутствия ICEs был установлен по наличию гена интегразы, входящего в состав элемента, с использованием двух пар праймеров. Таким образом из большого числа штаммов холерных и других вибрионов были отобраны позитивные для дальнейшего углубленного анализа и типирования.

В **главе 4** представлены результаты детекции 5 генов резистентности к антимикробным агентам (*sulII*, *strB*, *dfrA1*, *dfr18*, *kan*) в ICEs отобранных позитивных штаммов. Результаты типирования позволили выявить у холерных вибрионов раз-

ных серогрупп 5 типов ICEs, из которых 1 оказался «пустым», т.е. лишенным искомым генов-мишеней, остальные содержали от 1 до 4 генов. «Пустые» ICEs выявлены и у нехолерных вибрионов, кроме единственного штамма, содержащего *dfrA1*. Заключение о действительном отсутствии генов в локусе *rumB* было бы более обоснованным, если бы дополнительно была проведена ПЦР с праймерами для амплификации фрагмента этого локуса, в которой ампликон образуется только в случае отсутствия вставки.

В **Заключении** подведены итоги работы, подчеркнуто быстрое распространение ICEs в популяциях вибрионов и высказаны предположения о значимости этого явления в нарастании множественной лекарственной устойчивости. Представляет интерес выявленная соискателем корреляция между присутствием ICEs с тремя и более генами резистентности и наличием профага СТХ и острова патогенности VPI, хотя предположение о том, что «...нельзя исключать вероятность наличия среди генов с неизвестными функциями СТХф и/или VPI-1 факторов, которые облегчают приобретение новой ДНК...» можно считать правомерным только по отношению к VPI, т.к. функции всех генов СТХф давно известны.

Работа написана в целом грамотно, аккуратно оформлена, однако полученные результаты изложены и обсуждены довольно кратко, в связи с чем возникают следующие вопросы:

1. Считаете ли Вы штаммы с «пустыми» ICEs потенциальными реципиентами генов антибиотикоустойчивости и вытекающего отсюда возможного участия в их распространении?

2. Можно ли однозначно исключить нехолерных вибрионов, циркулирующих в наших водоемах, из списка потенциальных доноров детерминант антибиотикорезистентности и в дальнейшем не придавать им особого значения? Или они все же могут передавать холерным вибрионам «пустой» элемент и делать их реципиентами новых генов?

3. Допускаете ли Вы возможность присутствия в ICEs изученных штаммов холерных вибрионов других генов резистентности, которые не вошли в число исследованных Вами? Например, гены устойчивости к тетрациклину и эритромицину, которые по данным литературы могут в нем содержаться (Wozniak *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2016).

4. Обязательно ли гены *dfrA1* и *kan* находятся в горячих точках HS3 и HS5 соответственно или они могут встраиваться в другие участки ICE? Предполагается ли в дальнейшем проверка этих положений с помощью секвенирования и анализа полученных сиквенсов?

Тем не менее, все задачи исследования выполнены в полном объеме, полученные данные имеют бесспорный приоритет и перспективы внедрения в практику. Высказанные выше замечания не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации. Все научные положения

обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Автореферат и научные публикации, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, отражают основное содержание работы. Автореферат оформлен в соответствии с необходимыми требованиями.

Тема и содержание диссертации соответствуют п.2 и п.3 паспорта специальности 03.02.03. – микробиология.

Заключение

Изложенное позволяет заключить, что представленная к защите диссертация **Замарина Антона Александровича** «Детекция и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп» является завершенной научно-квалификационной работой, которая по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления от 21.04.2016 г., № 335), а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Ведущий научный сотрудник ФКУЗ
Ростовский-на-Дону противочумный
институт Роспотребнадзора,
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник



Монахова Елена Владимировна

(ул. М.Горького, 117/40
Ростов-на-Дону 344002
Тел. (863) 240-91-33 раб.
8 960 4560864 моб.
e-mail monakhova_ev@antiplague.ru)

Подпись Монаховой Е.В.

ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный
институт Роспотребнадзора



Стоян Елена Евгеньевна

04.09.2018г