



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного
Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора**
664047 Иркутск, Трилиссера, 78
Тел. 22-01-35, факс 22-01-40
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru
<http://www.irkutsk.ru/chumin>
ОКПО 01898090, ОГРН 10223801543017
ИНН/КПП 3811015807/381101001

УТВЕРЖДАЮ

директор института
докт. мед. наук, профессор
Балахонов С.В.



«13» сентября 2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Замарина Антона Александровича «Детекция и молекулярное типирование интегративных коньюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Проблема множественной лекарственной устойчивости приобретает все большую актуальность для отдельных групп микроорганизмов, в том числе и для возбудителей особо опасных инфекций. Механизмы лекарственной устойчивости микроорганизмов разнообразны и включают в себя как универсальные клеточные механизмы, так и приобретение коньюгативных плазмид, транспозонов, интегронов или интегративных коньюгативных элементов.

Резистентность возбудителя холеры *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп к антибактериальным препаратам стала нарастать в 90-е гг. прошлого столетия и в настоящее время представляет проблему здравоохранения в мире. Работы по изучению профиля устойчивости и чувствительности к антибиотикам проводятся как на уровне фенотипических свойств возбудителя холеры, так и на геномном уровне. Известно, что у холерного вибриона один из основных механизмов формирования антибиотикорезистентности – накопление целевых генов в составе мобильных генетических элементов. Формирование за счет реализации

горизонтального переноса генетических блоков устойчивых к действию антибиотиков форм возбудителя рассматривается как один из механизмов адаптации к неблагоприятным внешним факторам. Соответственно, мониторинг наличия генетических детерминант в циркулирующих ныне штаммах, а также ретроспективная оценка трансформации набора генов антибиотикорезистентности представляют большую значимость.

Учитывая изложенное, диссертационное исследование А.А. Замарина, направленное на детекцию и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп актуально и своевременно.

Основная цель диссертационной работы заключалась в анализе распространенности и молекулярном типировании интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации. Для достижения данной цели автор поставил перед собой ряд четко и ясно сформулированных задач, которые последовательно и убедительно решил в диссертации.

Новизна полученных результатов и выводов диссертации. Новизна результатов диссертационного исследования очевидна, поскольку получены новые данные о наличии интегративных конъюгативных элементов в штаммах *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ, впервые проведен анализ молекулярной структуры вариабельных последовательностей горячих точек в геноме выделенных на территории РФ штаммов, осуществлен скрининг других микроорганизмов рода *Vibrio*, выделенных на территории Волгоградской области, на наличие интегративных конъюгативных элементов.

Автором установлено учащение случаев завоза в РФ полирезистентных штаммов в период третьей волны седьмой пандемии, определена широкая распространенность SXT элемента в геноме региональных штаммов *V. cholerae* и *Vibrio spp.*, идентифицирована его организация.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов. Научную значимость представляют полученные автором данные о вариабельности структуры SXT элемента в штаммах холерного вибриона разных серогрупп, а также в геномах представителей других микроорганизмов рода *Vibrio*.

Разработанные методические приемы и аналитические алгоритмы интегрированы в практику и используются в ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт для паспортизации и углубленного изучения свойств штаммов холерных вибрионов.

В Государственную коллекцию патогенных бактерий ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора депонированы два штамма с оригинальными вариантами интегративных конъюгативных элементов.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Положения, выносимые на защиту, выводы и заключение диссертации обоснованы, отражают результаты работы и соответствуют поставленной цели и задачам. О достоверности результатов работы свидетельствует значительный объем выборки штаммов и образцов ДНК, а также использованный в работе последовательный алгоритм, предусматривающий первичный скрининг SXT и дальнейший детальный анализ целевой области ДНК разных групп штаммов.

Личный вклад диссертанта в работу можно оценить на основании публикаций, в двух из которых Антон Александрович является первым автором.

Оценка содержания диссертации, её завершённость в целом, предложения по оформлению. Диссертация А.А. Замарина изложена на 99 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, проиллюстрирована 13 рисунками и 17 таблицами. Список использованных источников литературы включает 146 работ, в т.ч. 16 отечественных и 130 зарубежных.

Во «Введении» автором обосновывается актуальность работы, формулируется цель и задачи исследования, указывается научная новизна, теоретическая и практическая значимость, приводятся данные об апробации.

Глава 1 посвящена анализу литературы по теме диссертации и включает восемь подглав. В данной главе подробно описана история пандемий холеры, современное состояние заболеваемости, представлена информация по таксономии и культурально-морфологическим свойствам *V. cholerae*. Оценивая ситуацию по

холере в России автор, к сожалению, представляет неверные данные о заболеваемости в период эпидосложнений на Дальнем Востоке в 1999 г. (по информации автора – в период вспышки в Приморье выявлено 66 больных и 21 вибриононоситель, тогда как на территории Дальнего Востока в 1999 г. в период двух вспышек (г. Владивосток и г. Южно-Сахалинск) по литературным данным (без учета завозных случаев) было зарегистрировано 34 больных и 16 вибриононосителей). Кроме того, диссертантом указано, что в 2001 г. в Республике Татарстан имел место «отдельный завозной случай холеры», тогда как в данный период на территории протекала вспышка холеры с регистрацией 52 больных и 18 вибриононосителей.

При характеристике генома возбудителя холеры описаны мобильные генетические элементы и детерминанты патогенности. В разделе «генетическое разнообразие холерных вибрионов» диссертант, на наш взгляд, излишне подробно останавливается на характеристике генетически измененных клонов вибриона Эль Тор с детальным анализом свойств измененных, матлабских, гибридных вариантов, несущих *ctxB1* аллель гена холерного токсина. В то же время оказалась не отражена современная информация о доминирующих в настоящее время при эпидосложнениях вариантах вибриона Эль Тор с *ctxB* 7 аллелью указанного гена. При рассмотрении интегративных конъюгативных элементов в работе дана историческая справка их появления, описаны механизмы встройки и функционирования в составе генома, структурные единицы, пути эволюции и потенциал для вариабельности. По данному вопросу обращает на себя внимание глубина проработки проблемы антибиотикоустойчивости штаммов *V. cholerae*.

В главе 2 представлены данные об объемах и методических подходах к исследованию. Всего в работу включено 150 штаммов *V. cholerae* nonO1/O139 и *Vibrio spp.*, выделенных в Волгоградской области в 2013-2014 гг. и 108 образцов ДНК *V. cholerae*, представленных ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Перечень используемых штаммов и образцов ДНК изложен в таблице на восьми страницах текста, однако отсутствуют данные о видовой принадлежности включенных в исследование штаммов микроорганизмов рода *Vibrio*, которые способствовали бы уточнению доминирующих таксонов, содержащих в геноме интегративные конъюгативные элементы, а также об

исходной молекулярно-генетической характеристике штаммов *V. cholerae* O1 и O139 по комплексу детерминант патогенности. Далее дается описание постановки полимеразной цепной реакции, которая является ключевой методологией выполненной работы.

Глава 3 посвящена поиску интегративных конъюгативных элементов (ICE) семейства SXT/R391, несущих гены устойчивости к антимикробным препаратам, на основании ПЦР-детекции гена интегразы *int* SXT-элемента с двумя парами праймеров. Исследовались штаммы, выделенные из водоемов Волгоградской области в 2013-2014 гг., и образцы ДНК полирезистентных штаммов холерного вибриона с 1972 по 2012 г. В результате выявлены детерминанты интегративных конъюгативных элементов у значительной части исследованных штаммов из поверхностных водоемов Волгоградской области – около 50 % изолятов содержат в своем геноме интегративные конъюгативные элементы семейства SXT/R391. Что касается исследования образцов ДНК полирезистентных штаммов *V. cholerae*, то автором сделан вывод о том, что время завоза в РФ SXT-положительных вариантов холерного вибриона совпадает с распространением по миру штаммов третьей волны 7-й пандемии и появлением в Индии новой эпидемически значимой O139 серогруппы, характерной особенностью которой была множественная резистентность к антибактериальным препаратам.

В главе 4 представлены результаты типирования выявленных в ходе исследования элементов SXT/R391. Автором для анализа выбран ряд детерминант резистентности к антибактериальным препаратам, в частности, гены устойчивости к сульфаметоксазолу *sull*, стрептомицину *strB*, триметоприму – дигидрофолатредуктазы *dfr18* и *dfrA1*, канамицину *kan*, проведен их поиск в геномах исследуемых штаммов, проанализированы все выявляемые комбинации. Исследование трех локусов вариабельной ДНК (VRIII, HS3, HS5), которые могут содержать интрагенные вставки с детерминантами резистентности к антибактериальным препаратам, выявило различия в организации этих областей. При ПЦР-тестировании 14 полирезистентных *V. cholerae* сделан вывод об идентификации пяти уникальных типов SXT элемента: в частности, определены варианты, несущие специфичный для O139 и O1 серогрупп SXT элемент, а также варианты с измененной структурой указанного локуса (SXT^{ET}, лишенный гена

резистентности к канамицину; SXT^{ET}, содержащий только ген *dfrA1* в горячей точке; SXT^{ET}, полностью лишенный генов резистентности, и специфичный для O139 серогруппы SXT элемент, содержащий характерный для вибрионов Эль Тор ген резистентности к канамицину, обозначенный как гибридный). В отношении этих данных хотелось бы отметить, что включенные в исследование штаммы *V. cholerae*, выделенные при эпидосложнениях в РФ, имеют завозное происхождение, и соответственно определенный в их геномах SXT целесообразно, на наш взгляд, классифицировать с учетом международных подходов, сопоставляя его структуру с известными вариантами указанного элемента, идентифицированными на эндемичных по холере территориях.

Что касается результатов анализа структуры SXT элемента в штаммах из объектов окружающей среды Волгоградской области, то у *V. cholerae* nonO1/O139 идентифицировано три типа ICE, у штаммов микроорганизмов рода *Vibrio* – 2 типа. Также определен набор детерминант резистентности в геномах других представителей рода *Vibrio*, обнаруживаемых в настоящее время в водоемах Волгоградской области.

В заключении автор вновь подчеркивает актуальность изучения проблемы множественной лекарственной устойчивости холерного вибриона, обобщает результаты диссертационной работы, приводит обоснование предложенного обозначения выявленных вариантов SXT. Вместе с тем, следовало шире представить сравнительный анализ результатов исследования с данными, полученными исследователями из других стран или на других территориях РФ (в частности, Заднова С.П., Смирнова Н.И., 2015; Spagnoletti et al., 2014; Weil et al., 2017). Подводя итог, автор акцентирует внимание на том, что интегративные коньюгативные элементы семейства SXT/R391 получили быстрое распространение среди вибриофлоры поверхностных водоемов Волгоградской области и могут рассматриваться не только как структура, обеспечивающая приобретение генов резистентности, но и обеспечивать приобретение микроорганизмами других функций, определяющих адаптационные способности.

Выводы являются логическим завершением работы, согласуются с поставленными задачами и выносимыми на защиту положениями, четко формулируют основные результаты.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат представляет собой краткое содержание диссертации и включает в себя наиболее значимые результаты и табличный материал, позволяет получить целостное представление о проделанной работе и ее выводах.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. По теме диссертации опубликовано четыре научные работы, в том числе две – в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. Материалы работы представлены на Проблемной комиссии 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы» в 2016 и 2017 гг.

В целом диссертационная работа А.А. Замарина характеризуется новизной и актуальностью, содержит новые данные по вопросам изучения молекулярно-генетических и адаптивных особенностей холерного вибриона и его эволюции в ходе текущей пандемии. Высказанные выше замечания не снижают значимости проведенного исследования для науки и практики. Вместе с тем хотелось бы задать автору ряд вопросов:

1. В геноме каких представителей рода *Vibrio* наиболее широко представлены интегративные конъюгативные элементы семейства SXT/R391?
2. Учитывая подробную характеристику генетически измененных вариантов вибриона Эль Тор, представленную автором в обзоре литературы, возникает вопрос: как согласуется наличие SXT элемента установленного в настоящем исследовании типа со структурной организацией детерминант патогенности исследуемых штаммов, а именно: какие типы SXT идентифицированы у типичных вариантов вибриона Эль Тор и у завезенных в РФ генетически измененных вариантов?
3. Как соотносятся определенные в настоящей работе типы SXT с известными на сегодняшний день по литературным данным вариантами указанного элемента?
4. В каком направлении, по мнению автора, возможно совершенствование эпидемиологического надзора за холерой на основании полученных в диссертационном исследовании данных по типированию SXT элемента?

Заключение. Диссертация Антона Александровича Замарина «Детекция и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства

SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп» является завершенной научно-квалификационной работой, направленной на изучение актуальной проблемы формирования резистентности к антибактериальным препаратам у холерного вибриона, поиск и реализацию подходов к скринингу и типированию интегративных коньюгативных элементов, несущих детерминанты резистентности.

По актуальности, новизне, объему исследований, научно-практическому значению результатов диссертация А.А. Замарина соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 8 от 13.09.2018 г.

Доктор медицинских наук, заведующая лабораторией холеры
Федерального казенного учреждения здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-
исследовательский противочумный институт Сибири и
Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека

Л.В. Миронова

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории холеры того же института

А.С. Гладких

Подписи Мироновой Л.В. и Гладких А.С. заверяю
Начальник отдела кадров и спецчасти
того же института

Н.И. Шангареева



Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) 664047 г. Иркутск, Трилиссера, 78 Тел. (3952)22-01-35, (3952)факс 22-01-40 E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru).