

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Теца Виктора Вениаминовича на диссертационную работу Чагиной Ирины Алексеевны «Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология

### *Актуальность темы*

Дифтерия - острая антропонозная бактериальная инфекция, занимающая одно из ведущих мест среди воздушно-капельных инфекций. Наибольшая роль в распространении инфекции принадлежит больным дифтерией ротоглотки, особенно со стёртой и атипичными формами болезни. Источником инфекции являются также бактерионосители, выделяющие возбудитель в течение длительного времени, что определяет непрерывность эпидемического процесса даже без регистрируемой заболеваемости.

Дифтерия является вакцин управляемой инфекцией и введение массовых программ иммунизации позволили во многих странах снизить заболеваемость дифтерией до единичных случаев, и даже появились территории полностью свободные от дифтерии. Вместе с тем, несмотря на успешную многолетнюю массовую иммунизацию населения и благополучную эпидемиологическую ситуацию, проблемы дифтерийной инфекции сохраняют актуальность, Поддержанию эпидемического процесса способствуют бактерионосительство, увеличение числа лиц, восприимчивых к инфекции, заболеваемость среди привитых, которая связана с угасанием поствакцинального иммунитета с возрастом отсутствия достаточной ревакцинации. Кроме того, необоснованные отводы от прививок, а также увеличение миграции приводят к сокращению иммунной прослойки населения.

Основным в лечении дифтерии считают введение антитоксической противодифтерийной сыворотки. Однако, при субтоксической и токсических формах рекомендовано назначение антибиотиков, оказывающих действие на сопутствующую кокковую флору. При этом чаще всего используют

производные пенициллинового ряда, макролиды, тетрациклины и цефалоспорины. На фоне применения антибиотиков, отмечается распространение резистентных штаммов различных микроорганизмов в связи с чем лечение заболеваний микробного генеза становится затруднительным, и задача изучения антибиотикорезистентности возбудителя дифтерии является актуальной для медицинской микробиологии.

Кроме того, разработка и широкое применение современных молекулярно-генетических технологий позволяет с новых позиций подойти к изучению биологических свойств и антигенной структуры возбудителя дифтерии, определению механизмов антибиотикорезистентности, закономерностей циркуляции возбудителя среди населения с целью прогнозирования интенсивности эпидемического процесса и поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по дифтерийной инфекции.

Учитывая вышесказанное, тема диссертационной работы Чагиной Ирины Алексеевны является бесспорно актуальной как с научной, так и с практической точки зрения.

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

Поставленные диссертантом цель и задачи исследования успешно выполнены. На основании полученных результатов автором сформулированы положения и выводы, характеризующиеся высокой степенью научной новизны.

Диссертантом изучена антибиотикочувствительность популяции штаммов *C.diphtheriae* и выявлено до 5,6% штаммов *C.diphtheriae*, устойчивых к пенициллину, 3,6-3,7% - к макролидам и 4,7% - к рифампицину. В результате изучения последовательности гена groV впервые идентифицирован молекулярный механизм резистентности штаммов *C.diphtheriae* к рифампицину, заключающийся в наличии значимых

мутационных изменений в трех позициях - H431N, S436F, S436Y, P495L и P495Q.

Автором изучен геном мультирезистентного, токсигенного штамма *C.diphtheriae*, нуклеотидная последовательность которого аннотирована в международную базу данных GenBank/NCBI. Полученные результаты полноразмерного секвенирования позволили расшифровать молекулярные механизмы резистентности к макролидам, которые обусловлены наличием гена *erm(X)*, расположенного на новой, ранее неизвестной плазмиде, последовательность которой также готовится к аннотированию.

Диссертант впервые применил метод мультилокусного секвенирования ДНК для характеристики современной циркулирующей популяция штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России. В результате показана возможность его использования для наблюдения за возбудителем дифтерии. Идентифицировано 36 сиквенс-типов, среди которых преобладали два генотипа. Автором проведены сопоставления между биологическими свойствами *C.diphtheriae* - токсигенностью и биоваром - и принадлежностью к сиквенс-типу.

В работе изучена структура генов, кодирующих основные факторы патогенности, у современных токсигенных штаммов *C.diphtheriae*. Выявлены мутационные изменения в 6 позициях гена *tox*, и у четырех штаммов *C.diphtheriae* обнаружена значимая мутация в положении A305T; в гене *dtxR* идентифицированы мутации в 15 позициях, из которых ранее описаны мутации в положениях - A147V и L214I. Выявлена новая мутация в позиции (-23) промоторной области гена *dtxR*. Все эти данные свидетельствуют о закреплении ранее появившихся мутаций и нарастании полиморфизма в генах, кодирующих дифтерийный токсин и регуляторный DtxR белок. Кроме того, интересным оказался факт, что каждому сиквенс-типу была характерна определенная комбинация мутаций в гене *dtxR*.

Диссертантом расшифрован молекулярный механизм отсутствия экспрессии гена *tox* у четырех современных НТТН-штаммов *C.diphtheriae*,

обусловленный выпадением нуклеотида в позиции 55 гена *tox* и сдвигом рамки считывания. В структуре гена *dtxR* впервые у НТТН-штаммов *C.diphtheriae* выявлено наличие мутации, которая была ранее описана у токсигенных штаммов, и второй новой мутации в позиции 126 гена *dtxR*.

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Теоретическая значимость диссертационного исследования подчеркивается новыми данными о биологических свойствах, уровне и молекулярных механизмах антибиотикорезистентности, особенностях генетической структуры основных детерминант патогенности и генотипах штаммов *C.diphtheriae*, что дополняет понимание механизмов изменчивости и адаптационных возможностях популяции возбудителя дифтерии.

Практическая значимость работы заключается в подтверждении необходимости проведения мониторинга антибиотикорезистентных штаммов *C.diphtheriae*, что позволит осуществлять адекватную антибиотикотерапию и ее коррекцию при санации дифтерийных бактерионосителей.

Практическую ценность работы представляют результаты генотипирования штаммов *C.diphtheriae*, показавшие возможности использования мультилокусного секвенирования с целью расследования очагов дифтерии, выявления и слежения за распространением генотипов и завозных случаев для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия по дифтерийной инфекции в России.

Изученные штаммы *C.diphtheriae* послужили основой создания банка ДНК *C.diphtheriae*, которые характеризуются различным уровнем антибиотикочувствительности и генетической структурой (сиквенс-типами) и могут быть использованы в дальнейших исследованиях по прогнозированию распространения эпидемически значимых штаммов возбудителя дифтерии и изучения молекулярно-генетических механизмов их резистентности. В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы 16 штаммов *C.diphtheriae*.

### ***Достоверность и апробация результатов исследования***

Достоверность результатов диссертационного исследования не вызывает сомнений. Работа выполнена на большом объеме материала и определяется правильными теоретическими положениями, основанными на знании современной литературы, методологически верифицированными исследованиями и использованием сертифицированного оборудования. При выполнении исследований использован огромный спектр методов – от классических бактериологических до современных высокоинформативных молекулярно-генетических методов, программного обеспечения и международных баз данных генотипов, что позволило успешно решить поставленные задачи и получить достоверные результаты. Основные положения, выводы и практические рекомендации, которые были сформулированы автором, логично обоснованы. Кроме того, в работе проводится сравнение авторских данных с данными, опубликованными по этой тематике в мировой научной литературе, а также полученные результаты дополняют многолетний научный потенциал, созданный несколькими поколениями ученых института Габричевского.

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

Диссертационная работа написана научным языком, оформлена в виде рукописи на 206 страницах машинописного текста. Структура диссертационной работы Чагиной И.А. соответствует ГОСТ 7.0.11-2011. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы. В диссертации представлены 37 рисунков и 22 таблицы. Библиографический список содержит 324 источника, из них 143 - отечественных и 183 - зарубежных авторов.

Во введении автор обосновывает актуальность представленной научно-исследовательской работы и подробно отражает степень разработанности проблемы, формулирует цель и задачи для ее достижения, а также обобщает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы.

Обосновывает методологию и подробно описывает методы исследования, формулирует основные положения, выносимые на защиту. Диссертантом проведено исследование свойств штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в период 1957 – 2015 гг. от больных дифтерией и бактерионосителей. Штаммы *C.diphtheriae*, выделенные в период 2010 – 2015 гг., получены из бактериологических лабораторий различных территорий России.

В обзоре литературы даны современные научные представления о биологических свойствах коринебактерий дифтерии. Изложены основные сведения об эпидемиологической обстановке, методах лабораторной диагностики, особенностях клинической картины заболевания, что позволяет логично войти в курс рассматриваемой проблемы. Подробно представлена хронология разработки и использования различных методов наблюдения и типирования возбудителя дифтерийной инфекции, которые применялись для изучения его биологических свойств, как в нашей стране, так и зарубежом – от классических микробиологических, позволяющих оценить только фенотип, до высокотехнологических молекулярно-генетических. Изложены научные данные о фенотипических и молекулярно-генетических свойствах возбудителя дифтерийной инфекции. Особое внимание уделено характеристике антибактериальных препаратов и молекулярным механизмам резистентности к ним. Обзор написан полно, логично и читается с интересом.

Структура работы в разделе собственных исследований является отражением логического хода решения задач, поставленных автором для достижения цели диссертационного исследования.

В первом разделе собственных исследований представлены данные по изучению антибиотикочувствительности 888 штаммов *C.diphtheriae* с помощью диско-диффузионного метода и E-теста. Автором изучены молекулярные механизмы антибиотикорезистентности штаммов *C.diphtheriae* к макролидным антибиотикам и установлено, что резистентность выделенных штаммов *C.diphtheriae* к макролидам обусловлена наличием гена *erm(X)*, расположенного на описанной автором

плазмиде. Автором впервые проведены исследования по изучению механизма резистентности к рифампицину, Показано, что механизм резистентности заключается в наличии значимых мутационных изменений в трех позициях гена *groV* - 1291, 1307 и 1487.

В следующей главе собственных исследований представлены данные впервые проведенного полноразмерного секвенирования генома мультирезистентного токсигенного штамма *C.diphtheriae* № 17801 биовара *gravis*, в результате которого получен драфтовый сиквенс и нуклеотидная последовательность аннотирована в международную базу данных GenBank/NCBI. Результаты секвенирования дали возможность расшифровать последовательность R-плазмиды, несущей ген резистентности к эритромицину - *erm(X)*, а также описать локусы, ответственные за синтез пенициллинсвязывающего белка и резистентность к сульфониламидам.

Четвертая глава собственных исследований посвящена результатам мультилокусного секвенирования штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в России. Идентифицированы штаммы *C. diphtheriae* 36 сиквенс-типов с доминированием штаммов двух сиквенс-типов - ST25 и ST8 и показаны взаимосвязи между биоваром, способностью штаммов продуцировать токсин и их принадлежностью к определенному сиквенс-типу. Также проведено генотипирование НТТН-штаммов *C.diphtheriae* с различным механизмом отсутствия экспрессии гена дифтерийного токсина и идентифицированы уникальные генотипы, характерные для этих штаммов.

В пятой главе собственных исследований представлены результаты изучения особенностей молекулярно-генетической структуры основных генов патогенности у современных штаммов *C.diphtheriae*, кодирующих дифтерийный токсин и его регуляторный *dtxR* белок. Представлены результаты мониторинга 625 современных нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в различных регионах России, и выявлено 8 НТТН-штаммов биовара *mitis*, у четырех из которых расшифрован молекулярный механизм отсутствия экспрессии гена *tox*.

Анализ и обсуждение полученных результатов проведенного исследования приведены в разделе «Заключение», который представляет собой реферативное изложение основополагающих моментов диссертации.

Используемые в работе таблицы и рисунки позволяют легко воспринимать материал и делают диссертацию более демонстративной.

Автором лично проведены все основные этапы диссертационного исследования.

Диссертантом опубликовано 14 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях. Основные результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 10 Всероссийских научно-практических конференциях различного уровня. Результаты исследования были использованы на семинарах для практического здравоохранения в различных регионах Российской Федерации.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 03.02.03 – микробиология.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

По материалам диссертации возникают вопросы:

Что известно, о геномах коринефагов, несущих тох ген?

Какой из изученных Вами генов кажется наиболее перспективным для изучения изменчивости возбудителя дифтерии?

### ***Заключение***

Таким образом, диссертационная работа Чагиной Ирины Алексеевны «Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук Борисовой Ольги Юрьевны, содержащей новое решение актуальной научной задачи - представлена фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика, расшифрованы молекулярные механизмы антибиотикорезистентности популяции штаммов *C.diphtheriae*, что имеет

существенное значение для микробиологии. Диссертационная работа Чагиной Ирины Алексеевны «Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Чагина Ирина Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Официальный оппонент:

Профессор, академик РАЕН, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии им. академика Д.К. Заболотного Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СПбГМУ им. ак. И.П. Павлова МЗ РФ), член Президиума Санкт-Петербургского отделения Российского общества микробиологов, паразитологов и эпидемиологов.  
(197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8, корпус 36, тел. +7 (812) 499-70-49, vtetzyv@yahoo.com)  
доктор медицинских наук, профессор

В.В. Тец

Подпись Тец Виктор Вениаминович  
заверяю

