

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора Афанасьева Станислава Степановича на работу Беланова Сергея Сергеевича «**Фенотипическая и генотипическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге**», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы выполненной работы.

За счет высокой генетической пластичности *S. pneumoniae*, а также способности к горизонтальному внутри- и межвидовому обмену генетической информацией, высокому уровню бессимптомного носительства и прогрессирующему увеличению в популяции доли мультирезистентных клональных линий, остается уже много лет одним из ведущих патогенов и одной из основных причин детской смертности по всему миру. Благодаря таким особенностям своей биологии, бактерия *S. pneumoniae* способна максимально быстро адаптироваться к новым подходам по борьбе с ней. Борьба с пневмококковыми инфекциями на сегодняшний день основана на двух стратегиях: предотвращении развития пневмококковых инфекций путем массовой вакцинации населения и этиотропной терапии инфекций, развившихся у отдельных пациентов. Реализация обеих стратегий может быть успешной лишь при наличии данных о серотиповом и клональном составе каждой конкретной локальной популяции, а также данных об уровне устойчивости к антибактериальным препаратам. Создание максимально полной и актуальной базы данных по серотиповому составу, уровню антибиотикорезистентности и клональной структуре циркулирующих в Российской Федерации штаммов является актуальной задачей и важно, как для объективной оценки эпидемиологической ситуации в стране, так и для своевременной коррекции стратегий по борьбе с пневмококковыми заболеваниями.

В целом работа выполнена на современном методическом уровне, с использованием сертифицированного современного оборудования, что подтверждает **достоверность полученных результатов**. Стоит отметить, что на всех этапах исследования Беланов С.С. проводил сравнение полученных экспериментальных данных с описанными ранее в литературе.

Работа содержит принципиально новую, ценную научную информацию.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна диссертационного исследования заключается: в характеристике с использованием молекулярных методов серотипового состава пневмококковых популяций, вызывающих ведущие пневмококковые заболевания, а также бессимптомное носительство.

Автором произведена оценка потенциального покрытия популяции Санкт-Петербурга 7-ми, 10-ти и 13-ти валентными пневмококковыми конъюгированными вакцинами. Фактически автор являлся первопроходцем, заложившим основы для дальнейшего мониторинга и контроля эпидемиологической ситуации с пневмококковыми заболеваниями в Санкт-Петербурге. Им установлена связь между участвовавшими случаями множественной устойчивости изолятов *S. pneumoniae* к макролидным и бета-лактамам антибактериальным препаратам с проникновением в локальную популяцию глобальных генетических линий CC320, CC315 и CC423. Была осуществлена оценка глобального резистоста наиболее представленных в популяции штаммов. Дополнено, с использованием технологий ПЦР и полногеномного секвенирования, представление о формировании механизмов устойчивости к антибиотикам в локальной популяции.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации.

Автором создана электронная база данных клинического материала и чистых культур *S. pneumoniae*, собранных и обработанных в 2010-2015 гг. В коллекцию чистых культур ФГБУ ДНК ЦИБ ФМБА России было добавлено 250 изолятов чистых культур *S. pneumoniae*. В базу данных GenBank были депонированы риды и драфт-последовательности 13 изолятов пневмококка, секвенированных в ходе исследования. В международную базу данных pubmlst.org были добавлены данные 84 клональных линий, циркулировавших в Санкт-Петербурге в 2010-2015 гг. Полученные в ходе работы данные использованы для обоснования включения пневмококковых конъюгированных вакцин в Национальный календарь прививок Российской Федерации. На основании полученных данных, в 2013 г. в Санкт-Петербурге, при поддержке Благотворительного фонда Ростроповича-Вишневецкой, для массовой иммунизации детей в возрасте до 2-х лет была отобрана 13-валентная конъюгированная вакцина.

Внедрение результатов диссертационной работы. В отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии (Акт внедрения ФГБУ ДНК ЦИБ ФМБА России «Механизмы антибактериальной резистентности у пневмококков» от 01.12.2014 г.) и в отделении специфической профилактики инфекционных болезней и иммунодефицитных состояний (Акт внедрения ФГБУ ДНК ЦИБ ФМБА России «Оптимизированная методика по ПЦР-типированию серотипового состава *S. pneumoniae*, вызывающих респираторные и инвазивные инфекции в Санкт-Петербурге от 01.12.2018 г.) используются данные по уровню устойчивости к антибактериальным препаратам, а также оптимизированные методики по ПЦР-детекции возбудителя в клиническом материале, для повышения эффективности терапии и профилактики пневмококковых инфекций. Результаты оценки распространения среди пнев-

мококков резистентности к антибактериальным препаратам используются для оптимизации терапии респираторных инфекций в ФГБУ ДНК ЦИБ.

Содержание диссертации. Диссертационная работа представлена в виде рукописи, изложена на 102 страницах машинописного текста и включает Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, пять глав Результаты и обсуждения, Заключение, Выводы, Список использованных сокращений, Список использованных источников, который состоит из 210 литературных источников, из которых 26 – работы отечественных авторов и 184 – работы зарубежных авторов. Кроме того, текст диссертации иллюстрирован 17 таблицами и 15 рисунками.

Во **Введении** диссертантом описаны актуальность и степень разработанности темы исследования, чётко сформулирована цель исследования и задачи, достаточные для достижения поставленной цели. Отражена научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Положения, выносимые на защиту, охватывают основной материал диссертации. Также во введении отражены сведения об апробации результатов, личное участие автора в получении результатов.

Обзор литературы диссертации состоит из девяти разделов, содержит подробное описание имеющихся литературных данных по теме исследования, включает в себя общую характеристику *S. pneumoniae*, клиническое значение патогена и его генетическое многообразие. Особое внимание уделено факторам вирулентности и молекулярно-генетическим механизмам формирования устойчивости *S. pneumoniae* к антимикробным препаратам. Приведены данные по клональной структуре пневмококковой популяции и распространению глобальных клональных комплексов. Также описаны существующие подходы по идентификации и типированию бактерий.

В заключительной части обзора автор описывает основные существующие на сегодняшний день стратегии по профилактике и терапии пневмококковых заболеваний и приводит интересные данные по текущей ситуации в мире и Российской Федерации. Приведённые в литературном обзоре данные преимущественно базируются на источниках последних 5-10 лет и формируют современный взгляд на бактерии *S. pneumoniae* и, ещё раз, подчёркивают актуальность выбранной темы.

В разделе «**Материалы и методы**» достаточно подробно описаны использованные в работе материалы и методики проведённых исследований, включающие в себя все этапы подготовки и анализа объектов исследования. Материалы этой главы показывают широкий диапазон использованных методов, освоенных автором диссертации: дизайн исследования, микробиологические методы, молекулярно-биологические методы, методики детекции генов ворсинок, мультилокусного сиквенс-типирования и полногеномного секвенирования. Несомненно,

мненным достоинством работы является использование методов полногеномного секвенирования штаммов, являющихся наиболее информативными и предоставляющими возможность проведения комплексного анализа геномов.

Изложению и обсуждению результатов диссертации посвящено пять глав. В Главе 3 приведены результаты исследования серотипового состава циркулирующих в Санкт-Петербурге штаммов *S. pneumoniae*. В исследование было включено всего 1024 образца клинического материала и 250 чистых культур *S. pneumoniae*, в том числе: 482 образца аспирата среднего уха от больных острым отитом, 542 образца крови от больных внебольничной пневмонией (ВБП), 133 чистых культуры выделенных от бессимптомных носителей и 122 культуры от больных различными пневмококковыми заболеваниями. Исследование выявило в общей сложности 18 серотипов и серогрупп, встречающихся у детей, больных острым средним отитом (ОСО), преобладающими серотипами оказались 19F (28,1 %), 3 (19,3 %) и 14 (8,3 %). Интересно, что для старшей возрастной группы характерно более равномерное распределение серотипов, доля редких и нетипируемых штаммов возрастает до 44,2 %, но при этом сохраняется высокая доля встречаемости 3 серотипа (21,7 %). Была произведена оценка эффективности основных конъюгированных пневмококковых вакцин для популяции *S. pneumoniae* в Санкт-Петербурге. У детей, больных ОСО, серотипы, входящие в ПКВ7/10 составили 53,6 % от общего количества, при этом вместе с серотипами ПКВ13 эта цифра уже составляла 77,1 % популяции, доля невакцинных серотипов составила 12,9 %, 10 % представляли нетипируемые штаммы. Интересно, что процент встречаемости серотипов отличался в зависимости от возрастной группы, так, для детей младшей группы (менее 2 лет) процент серотипов, входящих в ПКВ7/10 и ПКВ13, составлял, соответственно, 64,9 % и 87,8 %, для категории среднего возраста (от 2 до 5 лет) – 57,3 % и 80,1 %, у детей старшей группы (5-18 лет) процент вакцинных серотипов падал до 32,0 % и 56,5 %, соответственно. У больных внебольничной пневмонией распределение серотипов по возрастным группам практически не отличалось и составило 57,1 % и 71,4 % для ПКВ7/10 и ПКВ13 у возрастной группы до 18 лет и 51,6 %, и 68,2 % - для ПКВ7/10 и ПКВ13 у группы старше 18 лет. Анализ распределения серотипов в чистых культурах дал следующие результаты: всего ПКВ7/10 и ПКВ13 были представлены соответственно 60,8 % и 73,6 % серотипов. Если рассматривать распределение частоты случаев ОСО пневмококковой этиологии по возрастным группам, то наблюдается преобладание случаев заболевания у детей младшей группы (до 2 лет) – 62,6 %; 41 % - у детей от 2 до 5 лет; у детей старшей возрастной группы (5-18 лет) доля пневмококковых отитов снижается до 26,4 %. Автор делает вывод, что группой риска, наиболее подверженной пневмококковым отитам, является именно группа детей младшего возраста (до 5 лет). Результаты новые, актуальные для современной микробиологии.

Глава 4 посвящена оценке устойчивости к антибактериальным препаратам. Автором были получены следующие результаты: к пенициллину были устойчивы 9,6 % всех изолятов, к амоксициллину – 2,0 %, к цефотаксиму и цефтаролину – по 1,2 %, к клиндамицину – 14,0 %, к эритромицину – 31,2 %, к тетрациклину – 33,2 %, к хлорамфениколу – 46,2 %. Стоит отметить, что 22,8 % изолятов характеризовались множественной устойчивостью к макролидным и бета-лактамам антибиотикам одновременно. На основании полученных данных автор делает вывод о необходимости снижения доли макролидных антибиотиков при терапии пневмококковых заболеваний, вследствие их малой эффективности и общего роста количества резистентных к ним изолятов. По итогам исследования подтвердилась традиционно высокая устойчивость к антибактериальным препаратам штаммов 19А серотипа. Все 11 изолятов этого серотипа проявляли выраженное в разной степени снижение чувствительности к пенициллину, а также отличались от других серотипов наиболее высокой частотой устойчивости амоксициллину, цефотаксиму, цефтаролину, эритромицину и тетрациклину. Для других распространенных серотипов (19F, 6A/B/C и 14) также была характерна высокая частота устойчивости к пенициллину, варьирующая приблизительно от 30 до 60 %, и к эритромицину – от 29 до 46 %. Следует отметить относительно высокую частоту устойчивости к антибиотикам среди нетипируемых изолятов, которые были выделены, в основном, от здоровых носителей. Важной особенностью была низкая частота устойчивости среди достаточно распространенного серотипа 3. Из 24 изолятов этого серотипа лишь единичные проявляли снижение чувствительности к пенициллину, эритромицину и другим антибиотикам. Значительная роль *S. pneumoniae* серотипа 3 в этиологии ОСО (21 % случаев) проявилась в несколько меньшей частоте устойчивости среди пневмококков, выделенных от пациентов с отитами, в сравнении с другими группами.

В **Главе 5** диссертант приводит результаты по детекции в штаммах *S. pneumoniae* генов ворсинок и приходит к выводу, что, на основании исследования, сложно выявить закономерность, подтверждающую роль пилей в патогенезе пневмококка и позволяют лишь выдвинуть гипотезу о возможной роли ворсинок II типа в колонизации верхних дыхательных путей и отсутствия их роли в проникновении в полость среднего уха.

Глава 6 посвящена оценке клональной структуры популяции *S. pneumoniae* методом МЛСТ. По итогам исследования в Санкт-Петербурге было выявлено 48 клонов *S. pneumoniae*, большинство из которых относятся к 8 глобальным клональным комплексам. Наиболее интересен из них клональный комплекс 320, представленный линиями 19А/Ф серотипов, характеризующийся множественной устойчивостью к целому ряду антибактериальных препаратов.

Отдельно стоит отметить, что в ходе выполнения работы впервые в России было проведено полногеномное секвенирование изолятов *S. pneumoniae*, с его помощью были заложены предпосылки для будущих фундаментальных исследований биологии этих бактерий и механизмов, отвечающих за их патогенез и вирулентность.

Приведённое в работе «**Заключение**» обобщает результаты пяти глав исследования. Выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам и основным положениям, выносимым на защиту.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из которых 5 - в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 7 тезисов, опубликованных в материалах Всероссийских и международных научных конференций и 2 работы в виде прочих публикаций.

Общее впечатление о диссертационной работе Беланова С.С. положительное. Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальностям 03.02.03 – «микробиология», по которой представляется к защите. Автореферат отражает сущность диссертационной работы.

Однако в процессе ознакомления с диссертационной работой возникли вопросы: 1- Каким образом была осуществлена валидация генов-мишеней для ПЦР реакций, на основании чего происходил выбор мишеней для каждой отдельно взятой мультиплексной реакции? 2- Все существующие вакцины на сегодняшний день серотип-специфичны и являются эффективными только для ограниченного количества серотипов, какова вероятность всплеска встречаемости «невакцированных» серотипов, какие из них представляют наибольший интерес на сегодняшний день?

В тексте диссертации отмечен ряд ошибок, погрешностей, неточностей некоторых выражений и технических опечаток. Есть общие замечания по оформлению обозначений и содержанию, которое излишне подробно представлено. Все сделанные замечания и рекомендации не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение.

Диссертационная работа Беланова Сергея Сергеевича на тему «Фенотипическая и генотипическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является законченным самостоятельным исследованием, в котором решена задача по молекулярно-генетической характеристике популяции *S.pneumoniae*, циркулирующей в Санкт-

Петербурге, важной для оценки эффективности современных пневмококковых вакцин и антибактериальных препаратов, своевременной коррекции подходов по профилактике и терапии пневмококковых заболеваний, а также являющейся стартовой точкой в процессе мониторинга за генетических процессов происходящих в популяции. Полученные данные являются актуальными для молекулярной микробиологии и клинической микробиологии.

По актуальности, объёму, новизне, и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Беланова Сергея Сергеевича соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК РФ (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Беланов Сергей Сергеевич заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Официальный оппонент:

Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник
ФБУН «Московский научно-
исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора

 Афанасьев Станислав Степанович

Подпись С.С. Афанасьева заверяю.
Начальник отдела кадров
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора

 Т.М. Лазунина

Федеральное бюджетное учреждение
науки «Московский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
г. Москва, Северный административный округ,
125212, улица адмирала Макарова, д.10.
Телефон: +7 (495) 452-1816
Факс (495) 452-1830
Email: info@gabrich.com