

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Припутневич Татьяны Валерьевны на диссертационную работу Хохловой Ольги Евгеньевны на тему **«Молекулярно-генетические особенности нозокомиальных и внебольничных MRSA и их роль в развитии инфекционных заболеваний различного генеза»**, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 - «микробиология»

Актуальность избранной темы диссертации.

Staphylococcus aureus является актуальным возбудителем инфекционных заболеваний человека, обуславливающим значительный уровень заболеваемости и смертности во всем мире. Инфекционные заболевания, обусловленные метициллинрезистентными *S. aureus*, варьируют от неинвазивных заболеваний, таких как кожные инфекции, до таких тяжелых состояний, как остеомиелит, эндокардит, сепсис. Инфекции, вызванные MRSA, имеют высокую социально-экономическую значимость и являются проблемой здравоохранения во всем мире. MRSA характеризуются изменчивостью генома, что приводит к изменению вирулентности штаммов и формированию устойчивости к антимикробным препаратам. Исследования молекулярно-генетических особенностей штаммов MRSA необходимо проводить регулярно. Быстрая идентификация различных генетических вариантов MRSA крайне важна для эпидемиологического контроля распространения и профилактики инфекций, вызванных таким микроорганизмом.

Характеристика популяционной структуры штаммов MRSA, циркулирующих на территории г. Красноярск и Красноярского края, оценка их роли в развитии заболеваний разного генеза, а также разработка доступных методов генотипирования имеет важное научно-практическое и социальное значение.

Представленные в диссертационной работе Хохловой Ольги Евгеньевны исследования направлены на выявление частоты встречаемости MRSA среди здоровых жителей г. Красноярска и Красноярского края и пациентов с разными нозологиями и оценку их роли в развитии заболеваний разного генеза; на определение клональной принадлежности штаммов MRSA, участвующих в развитии заболеваний разного генеза и их эпидемической значимости; изучение молекулярно-генетических маркеров вирулентности, генов-регуляторов и уровня экспрессии генов вирулентности и регуляторных генов; определение антибиотикочувствительности и изучение механизмов формирования резистентности к антимикробным препаратам штаммов MRSA, выделенных от здоровых жителей и пациентов медицинских учреждений г. Красноярска и Красноярского края; изучение полной структуры генома двух штаммов MRSA, являющихся основными представителями наиболее распространенных генетических вариантов и выделенных от больных с внебольничной и госпитальной инфекциями; определение генетических связей между штаммами MRSA, циркулирующими на территории г. Красноярска и Красноярского края, и представителями российской и глобальной популяции, и оценка их эпидемической значимости; на определение маркеров и разработку методов быстрого скрининга генетических вариантов MRSA, распространенных в г. Красноярске и Красноярском крае и на территории РФ.

Диссертация написана в традиционной форме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы и списка литературы, состоящего из 543 источников, 474 из которых – зарубежные. Диссертация изложена на 415 страницах машинописного текста, что на мой взгляд весьма избыточно, иллюстрирована 44 таблицами, 58 рисунками.

Глава 1 (обзор литературы) содержит современные данные научных публикаций отечественных и зарубежных авторов по вопросам

эпидемиологии метициллинрезистентных *S. aureus*, распространению основных клонов и линий в мире, изучению факторов вирулентности и резистентности *S. aureus*, включая MRSA, к антимикробным препаратам, исследованиям структуры генома микроорганизмов, различным методам типирования и вопросам эволюции MRSA.

В главе 2 описаны материалы и методы, используемые для исследования. В работе использованы изоляты MRSA, выделенные как от носителей, так и от пациентов с различными гнойно-воспалительными процессами, а также контрольные штаммы. При выполнении работы соискателем использованы основные методы: бактериологический, молекулярно-генетические, серологические, биоинформационные и методы статистической обработки результатов.

Глава 3 посвящена выявлению частоты встречаемости *S. aureus*, включая MRSA, среди здоровых жителей г. Красноярска, Красноярского края и пациентов с различными нозологиями, а также изучению роли MRSA в развитии заболеваний разного генеза. Определены показатели колонизации *S. aureus*, включая MRSA, среди детей дома ребенка, школьников, спортсменов, студентов и медицинских работников. Установлен низкий уровень носительства MRSA в популяции практически здоровых жителей г. Красноярска, Красноярского края. Выявлена роль MRSA в развитии внебольничных и госпитальных инфекций, удельный вес которых среди госпитальных инфекций достигает 62,2 %.

Глава 4 посвящена изучению молекулярно-генетических особенностей MRSA, выявлению уровня продукции факторов вирулентности и механизмов антибиотикорезистентности штаммов MRSA, выделенных в г. Красноярске, Красноярском крае. Установлено распространение двух доминантных линий MRSA на территории г. Красноярска, Красноярского края - ST239 и ST8. При этом штаммы, относящиеся к линии ST239, являются госпитальными, а штаммы линии ST8 являются внебольничными, но были выявлены и в условиях стационара. Минорными генетическими вариантами MRSA,

выделенными на территории Красноярского края, являются ST12 и ST30. Определены уровни экспрессии основных генов вирулентности и уровни продукции факторов вирулентности.

Глава 5 посвящена изучению структуры геномов двух штаммов, являющихся представителями основных клонов MRSA, циркулирующих на территории г. Красноярска, Красноярского края. Проведено полногеномное секвенирование штаммов и выполнен биоинформационный анализ, в ходе которого установлена уникальность структуры генома у штаммов – представителей доминантных линий MRSA на территории г. Красноярска, Красноярского края - ST239 и ST8.

В главе 6 проведено сопоставление генетических вариантов MRSA, распространенных на территории г. Красноярска, Красноярского края, и их эволюции со штаммами MRSA, распространенными в других регионах России и за рубежом. Установлено, что штаммы ST239_{Kras} сохранялись и распространялись среди пациентов и носителей (медицинских работников), по крайней мере, с 2007 года на территории г. Красноярска, Красноярского края. Выдвинута гипотеза о том, что, эволюционно ST239_{Kras} возникли на основе Бразильского клона с возможным маршрутом передачи Бразилия - Европа - Россия. Штаммы линии ST8 сохранялись и распространялись на территории г. Красноярска, Красноярского края, по крайней мере, с 2007 года и относились к уникальному клону MRSA ST8_{Kras}.

В главе 7 представлены результаты разработки варианта ПЦР для детекции линий ST239 и ST8, распространенных в России. Предложено использовать вариант мультиплексной ПЦР с применением разработанных праймеров и условий реакции для быстрой детекции штаммов MRSA линии ST239, распространенных в России. В геноме штамма, относящегося к генетической линии ST8, выявили наличие большой геномной инверсии MbIN. Установлено, что наличие MbIN характерно для штаммов, распространенных не только в Красноярском крае, но и в других регионах РФ.

Для выявления MbIN были сконструированы праймеры и разработаны условия проведения ПЦР.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации и автореферате.

Высокая степень достоверности и обоснованности полученных результатов и выводов диссертации не вызывает сомнений и отражает правильный выбор методических подходов. Степень достоверности полученных результатов основана на использовании большого фактического материала, полученного на зарегистрированном, прошедшем метрологическую поверку оборудовании с использованием широкого спектра современных научных методов. Все данные получены в повторяющихся экспериментах.

В автореферате диссертационных исследований Хохловой О.Е. четко представлены основные положения, выносимые на защиту, связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования, степень достоверности и апробация работы, методология и методы исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, заключение и 7 выводов, которые в достаточной мере аргументированы, отражают содержание диссертации и отвечают цели, задачам исследования.

Полученные Хохловой О.Е. данные вносят весомый вклад в разделы микробиологии, связанные с проблемами эволюции микроорганизмов, установлением их филогенетического положения; выделением, культивированием, идентификацией микроорганизмов; морфологией, физиологией, биохимией и генетикой микроорганизмов; исследованием микроорганизмов на популяционном уровне.

Результаты диссертационного исследования представлены на конференциях различного уровня. Полнота изложения материалов диссертации отражена автором в опубликованных 59 научных работах, в том числе 23 статей - в периодических изданиях из перечня ведущих

рецензируемых научных журналов, утвержденного ВАК РФ. Получен один патент на изобретение.

Новизна научных положений, рекомендаций. Теоретическая и практическая значимость.

На основании проведенных исследований Хохловой О.Е. оценена значимость *S. aureus*, включая MRSA, в развитии инфекционных заболеваний разной нозологии; изучена микробиота и ее антибиотикорезистентность, а также роль *S. aureus*, включая MRSA, в развитии ИКМТ, остеомиелита, пневмонии, сепсиса, инфекционных осложнений у онкологических больных. Соискателем оценено современное состояние уровня носительства *S. aureus*, включая MRSA, в популяции практически здоровых жителей г. Красноярска, Красноярского края. Хохловой О.Е. охарактеризована клональная структура штаммов MRSA, выделенных от пациентов с различными нозологиями, и от практически здоровых жителей г. Красноярска, Красноярского края, и выявлена их связь с российскими и глобальными клонами MRSA; а также оценена эпидемическая значимость выделенных штаммов для территории г. Красноярска и Красноярского края, РФ, мира. Автором впервые получены сведения о генетическом профиле вирулентности и механизмах антибиотикорезистентности штаммов MRSA, выделенных от госпитализированных пациентов и здоровых носителей г. Красноярска, Красноярского края. Хохлова О.Е. провела анализ полной структуры генома двух штаммов MRSA; установила особенности структуры генома данных штаммов и их взаимосвязь с эволюцией MRSA и их вирулентностью и антибиотикорезистентностью. Соискателем определены молекулярные мишени, а также эффекторные молекулы, которые могут быть использованы для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, вызванных MRSA; разработаны варианты мультиплексной ПЦР и ПЦР для быстрого скрининга генетических вариантов MRSA.

Автор исследования представил экспериментально-практический материал, который послужил теоретической основой для совершенствования

доступных методик выявления клональной принадлежности штаммов MRSA; профилактики, лечения инфекций, вызванных MRSA; исследований эволюции MRSA. Полученная Хохловой О.Е. научная информация о структуре геномов штаммов MRSA, которые являются представителями двух распространенных клональных линий, позволит отслеживать эволюцию MRSA. Полученные в ходе исследований данные явились важным основанием для оптимизации профилактики и лечения инфекций, вызванных MRSA, которые используются в клинической практике.

Таким образом, поставленная автором цель и задачи диссертационного исследования успешно выполнены, а положения, выводы и рекомендации, сформулированные на основании полученных результатов, характеризуются высокой степенью научной новизны.

Сформулированные соискателем выводы хорошо обоснованы, оригинальны, соответствуют полученным экспериментальным данным и логически вытекают из обсуждаемого материала.

В рукописи имеются стилистические погрешности и множество грамматических ошибок. Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертационной работе нет. Однако по материалам работы у меня возник ряд вопросов:

1. Почему при разработке мультиплексной ПЦР для определения MRSA линии ST239 из комбинации *sea*, *sek*, *seq*, *spa* в качестве маркера ген *sek* не используется?
2. Почему в этой системе такая странная интерпретация: «если в М-ПЦР выявляли 4 или 5 указанных гена, то результаты оценивали, как положительные»? Допустим, мы выявили гены *tesA*, *pus*, *spa* и *seq*, это будут ST239? А *spa*, *seq*, *pus* и *sea* без *tesA*?
3. Можно ли модифицировать ПЦР-систему для работы в режиме реального времени? Работа с гелем усложнит использование разработанных методов в условиях рутинной работы микробиологических лабораторий.

Заключение

Диссертационная работа Хохловой Ольги Евгеньевны на тему: «Молекулярно-генетические особенности нозокомиальных и внебольничных MRSA и их роль в развитии инфекционных заболеваний различного генеза» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся новые научные данные, имеющего важное значение как для фундаментальной микробиологии, так и для здравоохранения РФ в целом.

По актуальности, научной новизне полученных результатов, теоретической и практической значимости, методическому и методологическому уровню, содержанию диссертационная работа Хохловой Ольги Евгеньевны «Молекулярно-генетические особенности нозокомиальных и внебольничных MRSA и их роль в развитии инфекционных заболеваний различного генеза» отвечает требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 г.), соответствует паспорту специальности 03.02.03 - «микробиология», а её автор, Хохлова Ольга Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по искомой специальности.

Официальный оппонент,
доктор медицинских наук,
заведующая отделом микробиологии,
клинической фармакологии и эпидемиологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.
Телефон: +7 495 4382510, Электронная почта: info@oparina4.ru

Припутневич Татьяна Валерьевна

Подпись Припутневич Т.В. заверяю:
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»
Минздрава России, к.м.н., доцент

Павлович Станислав Владиславович