

ФМБА РОССИИ

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Детский научно-клинический
центр инфекционных болезней
Федерального

медико-биологического агентства»
(ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России)

адрес: 197022, Санкт-Петербург

ул. Профессора Попова, д.9

тел. (812) 234-60-04 факс (812) 234-9691

e-mail: niidi@niidi.ru; nii_detinf@fmbamail.ru

ОКПО 01966495, ОГРН 1037828009548

ИНН/КПП 7813045265 / 781301001

28.11.2022 № 01-21/1622

на №

от

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО директора

Федерального государственного бюджетного учреждения
«Детский научно-клинический центр инфекционных
болезней Федерального медико-биологического
агентства»

канд. мед. наук, доцент

С.М.Захаренко

«28» ноября 2022 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА) на диссертационную работу Кузиной Екатерины

Сергеевны «**Интегроны классов 1 и 2 в штаммах мультирезистентных
грамотрицательных бактерий**»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы выполненной работы. Формирование устойчивости к антимикробным препаратам является эволюционным свойством микроорганизмов и неизбежным следствием широкого клинического применения антибиотиков, поэтому в разные периоды времени, в зависимости от перечня используемых в лечебных учреждениях антибиотиков разных функциональных групп, в популяциях микроорганизмов возникают и распространяются специфические механизмы резистентности, в том числе механизмы множественной лекарственной устойчивости. Фенотип множественной лекарственной устойчивости у бактерий формируется в результате аккумуляции генов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам разных функциональных групп. Причиной наблюдаемого повсеместно быстрого распространения таких механизмов является горизонтальный перенос генов, опосредованный мобильными генетическими элементами, особое место среди которых занимают интегроны. Интегроны – это природные системы клонирования и экспрессии генов устойчивости, представляющие собой универсальные «депо», аккумулирующие детерминанты антибиотикорезистентности. Интегроны обеспечивают один из важнейших механизмов

формирования новых полирезистентных вариантов возбудителей инфекций. Учитывая важную роль интегронов в процессах распространения антибиотикорезистентности, изучение их структуры и анализ представленности в штаммах бактерий, возбудителей инфекций человека, позволяет оценить современную эпидемиологическую ситуацию по распространению антибиотикорезистентности в популяциях бактериальных патогенов, определить молекулярные механизмы природы этой резистентности, прогнозировать дальнейшие эволюционные предпосылки развития антибиотикорезистентности и оптимизировать схемы лечения инфекционных заболеваний.

Наиболее распространены интегроны в геномах грамотрицательных бактерий класса Gammaproteobacteria. Поэтому актуальность исследования интегронов в штаммах грамотрицательных бактерий, вызывающих госпитальные и внегоспитальные инфекции у человека, несомненна. Идентификация широко распространенных в составе интегронов генетических кассет антибиотикорезистентности, а также обнаружение и характеристика новых, не описанных ранее генных кассет, описание молекулярных механизмов эволюции интегронов, их взаимосвязи с другими мобильными генетическими элементами, открывают дополнительные возможности для оценки современной эпидемиологической ситуации по антибиотикорезистентности популяций бактериальных патогенов, прогнозирования ее развития в ближайшем и отдаленном будущем, а также оптимизации клинических рекомендаций по антибиотикотерапии инфекционных заболеваний. Диссертационная работа Кузиной Екатерины Сергеевны посвящена изучению интегронов классов 1 и 2 в штаммах мультирезистентных грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2020 гг., несомненно, актуальна и соответствует требованиям современной науки и практики.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации. Автором диссертационного исследования проведен анализ представительной коллекции современных клинических штаммов грамотрицательных бактерий, в геномах которых идентифицированы 4 новых интегрона класса 1 и один новый интегрон класса 2. Описаны новые варианты генов - *dfrA12s*, *dfrA1-IS911*, *aadA6::ISPa21e*, *gsu87*, *aphA15d* и *bla_{PBL-1}*, что указывает на продолжающуюся эволюцию интегронных структур в геномах клинически значимых патогенов.

Кроме того, в рамках данной диссертационной работы, впервые описан резистом мультирезистентного изолята *Klebsiella pneumoniae*, выделенного в г. Москва в 2019 г.,

включающий в себя одновременно интегроны класса 1, ген цефалоспорины *bla*_{CTX-M-15} и гены карбапенемаз трех классов: класса А – *bla*_{KPC-2}, класса В – *bla*_{NDM-1} и класса D – *bla*_{OXA}.
48.

В исследовании с привлечением здорового населения диссертантом описано кишечное и респираторное носительство штаммов грамотрицательных бактерий, несущих интегроны класса 1 (36 % изолятов) и интегронов класса 2 (7 % изолятов), а также генов бета-лактамаз *bla*_{CTX-M} (29 % изолятов), *bla*_{TEM} (21 % изолятов), *bla*_{SHV} (18 % изолятов) и *bla*_{NDM} (8 % изолятов)*. При этом, впервые в России описано носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации. Практическая и научная ценность работы Кузиной Екатерины Сергеевны заключается, в первую очередь, в создании коллекции мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от людей в Российской Федерации в 2003-2020 гг. (n=2065), электронного каталога и базы данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» (зарегистрирована ФИПС №2020621657 от 31.07.2020 г.). Депонированные в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» 149 референс-штаммов грамотрицательных бактерий могут быть использованы в дальнейших работах по изучению механизмов антибиотикорезистентности.

Результаты исследования молекулярно-генетических особенностей штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в нейрореанимационном отделении г. Москвы, использованы для оценки эпидемиологической ситуации в отделении и выбора оптимальных мер по контролю госпитальных инфекций, вызванных патогенами с множественной лекарственной устойчивостью (Акт внедрения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ от 20.07.2022 г.).

Результаты работы автора представлены на международном уровне – в международной базе данных GenBank размещены 220 нуклеотидных последовательностей генов антибиотикорезистентности и 30 полногеномных последовательностей штаммов грамотрицательных бактерий.

Автором представлены методические рекомендации учрежденческого уровня «Лабораторный образец ПЦР тест-системы в реальном времени для детекции генов интегронов классов 1 и 2 у грамотрицательных бактерий». Кроме того, материалы

диссертационной работы использованы в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Диссертационное исследование Кузиной Е.С. базируется на обширном анализе литературных данных. Достоверность полученных результатов подтверждается проведением исследовательских работ современными методами, на поверенном оборудовании, в соответствии с международными рекомендациями. Для проведения изучения клинических штаммов были использованы микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы исследований.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Созданные коллекция мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, электронный каталог и база данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» могут быть использованы для сравнительного анализа фенотипических и генетических характеристик штаммов, выделяемых на территории Российской Федерации. Нуклеотидные последовательности генов антибиотикорезистентности, полные геномы штаммов мультирезистентных грамотрицательных бактерий и информация о клинических изолятах, размещенные в базе данных GenBank, могут быть использованы исследователям во всем мире. Лабораторный образец мультиплексной ПЦР тест-системы в режиме реального времени может быть использован для дальнейшего изучения молекулярных механизмов антибиотикоустойчивости.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, трех Глав результатов, Заключения, Выводов, Перечня сокращений и терминов, Списка использованных источников, Списка работ, опубликованных по теме диссертации и 4 Приложений. Текст диссертации содержит 31 таблицу и 44 рисунка. Библиографический указатель содержит 243 литературных источника, в том числе 13 публикаций отечественных и 230 зарубежных авторов.

Во «Введении» автор раскрывает актуальность проблемы, описывает степень разработанности темы исследования, четко формулирует цель и задачи, отражает научную новизну работы и теоретическую и практическую значимость, кратко описывает

методологию и методы исследований, формулирует основные положения, выносимые на защиту, описывает степень достоверности и апробации результатов, личное участие в получении результатов.

В «Обзоре литературы» (Глава 1) отражены современные данные о происхождении, структуре, эволюции и классификации интегронов, значимости интегронов классов 1 и 2 в геномах штаммов грамотрицательных бактерий в мире и в России, о вкладе интегронов в формирование фенотипов антибиотикорезистентности, вопросы представленности генных кассет в составе интегронов, а также основные методы изучения интегронных структур.

В описании «Материалов и методов» исследования (Глава 2) дана подробная информация об объектах исследования и используемых референс-штаммах. В достаточной степени описаны стандартные и модифицированные методики исследования со ссылками на первоисточники. В тексте приведены сведения о нормативно-методических документах, согласно которым проводились исследования. Приведена информация об использованных наборах реагентов и применяемых для анализа данных web-ресурсах и программном обеспечении.

В главе 3 «Детекция и идентификация интегронов классов 1 и 2 в клинических штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг.» описана распространенность и разнообразие интегронов классов 1 и 2 в геномах мультирезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации в 2003-2015 гг., описана чувствительность изолятов грамотрицательных бактерий созданной коллекции, выявлены основные молекулярно-генетические механизмы устойчивости к антибактериальным препаратам – интегроны классов 1 и 2, гены бета-лактамаз (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-48-like} и *bla*_{NDM}) и гены поринового белка *ompK36*. В изолятах выявлены 26 вариантов наборов генных кассет интегронов классов 1 и 2, идентифицирован 31 тип генных кассет. В ряде изолятов автором исследования описаны новые интегроны: четыре новых интегрона класса 1 In1249, In1379, In1360 и In1375 у *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, и интегрон класса 2 In2-IS911 у *Shigella flexneri*. Описаны также новые варианты генов *dfrA12s*, *dfrA1-IS911*, *aadA6::ISPa21e*, *gsu87*, *aphA15d* и *bla*_{PBL-1}.

Кроме того, в ходе данного диссертационного исследования была разработана мультиплексная ПЦР тест-система в режиме реального времени «Мультиплексная ПЦР-РВ тест-система: Гены интегронов классов 1 и 2», позволяющая определять гены интеграз классов 1 и 2, а также генные кассеты: аминогликозид-модифицирующих ферментов

aacA4, *aadA1*, *aadA5*, дигидрофолат-редуктаз *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12* и стрептотрицинацетилтрансферазы *sat2*), имеющая специфичность 100 % и чувствительность $\geq 0,008$ нг/мкл ДНК.

В главе 4 «Интегроны классов 1 и 2 в резистомах нозокомиальных патогенов, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2015-2019 гг.» представлены данные по трем одномоментным исследованиям носительства пациентами нейрореанимационного отделения грамотрицательных бактерий и генетических детерминант антибиотикорезистентности, проведенных в 2015, 2017 и 2019 гг. Автором оценен уровень носительства грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей внутрибольничных инфекций, который составил 78 % пациентов. Отмеченный высокий уровень присутствия интегров в геномах грамотрицательных бактерий возбудителей нозокомиальных инфекций представляет большую угрозу для здравоохранения, поскольку связан с формированием фенотипов множественной лекарственной устойчивости у патогенов. Показано, что значительная часть интегров локализуется на конъюгативных плазмидах, несущих одновременно другие детерминанты антибиотикорезистентности, в том числе гены карбапенемаз разных классов: класса А (*bla_{KPC-2}*), класса В (*bla_{VIM-2}* или *bla_{NDM-1}*) и класса D (*bla_{OXA-48}*). Показано, что такие плазмиды могут стабильно наследоваться в клетках *K. pneumoniae* не только в условиях селективного давления антибиотиков, но и в отсутствии такового. Данный факт продемонстрирован на примере мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* сиквенс типа ST39 капсульного типа K23, несущего гены трех карбапенемаз (*bla_{NDM-1}*+*bla_{KPC-2}*+*bla_{OXA-48}*), цефалоспоринызы *bla_{CTX-M-15}* и двух интегров класса 1. Отмечено, что поиск в базе данных NCBI продемонстрировал уникальность описанных в данном исследовании плазмид, наличие в их структуре разной степени гетерогенности по сравнению с референсными последовательностями.

Глава 5 «Резистомы грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых людей» содержит информацию о носительстве генов антибиотикорезистентности и грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей инфекций у человека, у сотрудников микробиологической лаборатории. Показано, что доля мультирезистентных бактерий составила 20 %. В геномах изолятов, выделенных от здоровых людей, выявлены гены бета-лактамаз, в том числе эпидемически значимых - цефалоспоринызы CTX-M-15 и карбапенемазы NDM-1. Кроме того, в ходе данного исследования впервые в России было описано носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1.

В разделе «Заключение» подведен итог значительной по объему проделанной работы, обобщены и проанализированы полученные данные. Выводы, представленные автором, отражают результаты собственного исследования и соответствуют поставленным перед исследованием задачам. Интерпретация полученных результатов не вызывает возражений. Текст диссертации в достаточной мере иллюстрирован. Наличие заключений в конце глав облегчает восприятие материала. Общее впечатление о работе положительное.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 1.5.11. Микробиология.

По материалам диссертации опубликовано 26 печатных работ, из них 5 статей - в реферируемых научных изданиях, индексируемых базами данных РИНЦ, Scopus и Web of Science, одна База данных, а также 20 тезисов, опубликованных в материалах Всероссийских и международных научных конференций.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы Кузиной Екатерины Сергеевны нет. Однако, в процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы для обсуждения:

Значительный интерес представило бы более подробное сравнение фенотипов и генотипов всех изолятов клебсиелл, для которых были получены полные геномы, поскольку, судя по резистому, все эти изоляты должны демонстрировать фенотип множественной устойчивости. Также заслуживают более подробного описания методы сборки крупных плазмид с использованием коротких прочтений.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат оформлен в соответствии с требованиями стандарта, а его содержание полностью соответствует основным положениям диссертации и дает полное представление о проделанной работе.

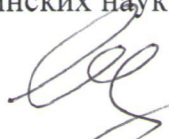
Заключение

Диссертационная работа Кузиной Екатерины Сергеевны на тему: «Интегроны классов 1 и 2 в штаммах мультирезистентных грамотрицательных бактерий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с характеристикой и оценкой представленности интегронов классов 1 и 2 в

штаммах клинически значимых мультирезистентных грамотрицательных бактерий, что важно для современной микробиологии и медицины.

По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Кузина Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Заведующий научно-исследовательским отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России член-корр.РАН профессор доктор медицинских наук



Сидоренко Сергей Владимирович

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»
197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9.
Телефон/факс: (812) 234-96-91
e-mail: niidi@niidi.ru

Подпись д.м.н., профессора Сидоренко С.В. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России

Канд.мед.наук доцент



Волжанин В.М.

Отзыв на диссертацию Кузиной Е.С. обсужден на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (протокол №12 от 24 ноября 2022 г.).