

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата медицинских наук Сухоруковой Марины Витальевны по диссертационной работе Кузиной Екатерины Сергеевны на тему «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

В настоящее время одной из значительных проблем здравоохранения является широкое распространение возбудителей инфекционных заболеваний человека, устойчивых к антимикробным препаратам, что ассоциировано с трудностями выбора адекватной терапии, удлинением сроков пребывания пациентов в лечебном учреждении, ухудшением прогноза заболевания. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, арсенал доступных для лечения инфекций лекарств повсеместно стремительно уменьшается в результате увеличения резистентности возбудителей инфекций к применяемым лекарствам, а также из-за недостаточно быстрой разработки новых антимикробных препаратов. Особую тревогу вызывает распространение микроорганизмов с множественной устойчивостью и экстремальной устойчивостью, все чаще приходят сообщения о выделении панрезистентных штаммов возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Мониторинг распространения таких штаммов очень важен для эпидемиологической оценки ситуации в конкретных лечебных учреждениях, регионах и т.д. Известно, что он существенно связан со спектром используемых антимикробных препаратов, профилем стационаров и уровнем контроля инфекционных заболеваний.

Диссертационная работа Е.С. Кузиной посвящена мониторингу распространенности интегронов классов 1 и 2, мобильных генетических элементов, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью

клинических штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации в период с 2003 по 2019 годы. Цель работы следует признать актуальной, оправданной как с теоретических, так и практических позиций. В своей работе диссертант поставила задачи, при решении которых были получены данные, которые вносят вклад в понимание роли интегронов классов 1 и 2 в формирование фенотипов множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий, возбудителей госпитальных инфекций; в том числе при носительстве генетических детерминант антибиотикорезистентности у госпитализированных пациентов и у здоровых людей. Методы, выбранные диссертантом для решения поставленных задач, следует считать вполне адекватными для выполнения диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Задачи диссертации полностью соответствуют поставленной цели и включают целый комплекс исследований:

1. Создание рабочей коллекции и электронного каталога мультирезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации в 2003-2019 гг., детекция в их геномах интегронов классов 1 и 2. Характеристика чувствительности изучаемых изолятов к антимикробным препаратам, детекция генов антибиотикорезистентности.

2. Идентификация генных кассет интегронов, оценка их представленности в изучаемых изолятах грамотрицательных бактерий, сравнение с распространенностью интегронных структур, размещенных в международной базе данных GenBank.

3. Анализ представленности интегронов классов 1 и 2 в ходе одномоментных обследований госпитализированных пациентов с проявлениями госпитальных инфекций и без клинических проявлений инфекций.

4. Анализ резистомов грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых сотрудников микробиологической лаборатории.

5. Депонирование референс-штаммов в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», размещение известных и

новых генетических кассет в базы данных GenBank и INTEGRALL. Создание базы данных интегронов классов 1 и 2, идентифицированных в геномах клинических штаммов грамотрицательных бактерий.

6. Разработка прототипа тест-системы для детекции интегронных структур в геномах грамотрицательных бактерий.

Для решения поставленных задач автором была разработана адекватная методология с использованием комплекса новейших и традиционных методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических.

Научная новизна состоит в том, что

- идентифицированы 4 новых интегрона класса 1: In1249 (*dfrA12s-orfF-aadA2*) [GB KT316808]; In1379 (*aadA6Δ3:ISPa21e-gcuD*) [GB KU926353]; In1360 (*gcu87-aadB-aphA15d-aadA1a*) [GB KX218442]; In1375 (*bla_{PBL-1}-aacA4*) [GB KY171972] и 1 новый интегрон класса 2 (*dfrA1Δ3:IS911e-sat1-aadA1*) [GB HM592262];

- описан резистом мультирезистентного изолята *Klebsiella pneumoniae*, выделенного в г. Москва в 2019 г., включающий в себя одновременно интегроны класса 1, ген цефалоспоринызы *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}*;

- определен уровень носительства 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) у 20 % здоровых сотрудников микробиологической лаборатории;

- впервые в России описано носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1.

Практическая значимость полученных данных подтверждается следующими положениями:

- создана коллекция мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий (n=2065), электронный каталог и база данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий»

(зарегистрирована ФИПС №2020621657 от 31.07.2020 г.) – Федеральный уровень внедрения;

- депонированы 149 референс-штаммов грамотрицательных бактерий, охарактеризованных на наличие генетических детерминант антибиотикорезистентности в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (Справки о депонировании 2018-2021 гг.) – Федеральный уровень внедрения;

- размещены 220 нуклеотидных последовательностей генов антибиотикорезистентности и 30 полногеномных последовательностей штаммов грамотрицательных бактерий в базу данных GenBank – Международный уровень внедрения;

- разработаны Методические рекомендации «Лабораторный образец ПЦР тест-системы в реальном времени для детекции генов интегронов классов 1 и 2 у грамотрицательных бактерий», утверждены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 27.04.2021 г., протокол №3, Акт межлабораторных испытаний экспериментальных образцов набора реагентов от 08.06.2022 г. – Учрежденческий уровень внедрения;

- материалы диссертационной работы используются в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва – Межведомственный уровень внедрения;

- материалы диссертационной работы используются в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (справка от 06.07.2022 г.) – Учрежденческий уровень внедрения.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа была выполнена в рамках НИР Роспотребнадзора «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» 2015-2020 гг. (номер регистрации ЕГИСМ

116030310007) и «Молекулярно-генетические механизмы вирулентности и резистентности бактерий к антибактериальным препаратам» 2021-2025 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 121022400056-5).

Степень достоверности, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается объемом проведенных исследований, использованием стандартных методов, а также апробацией результатов в виде 26 научных работ и изобретений, в том числе 5 статей в международных реферируемых научных журналах, одна База данных и 20 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа написана в классическом стиле, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, три главы собственных исследований, а также заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, список работ, опубликованных по теме диссертации, четыре приложения. Изложена на 180 страницах. Диссертация иллюстрирована 31 таблицей и 44 рисунками.

Во **Введении** автор показывает актуальность проведенного исследования, грамотно связывает с целью и задачами и в связи с этим обосновывает методологию и перечень необходимых методов, четко обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, формулирует положения, выносимые на защиту, которые конкретно и понятно отражают суть полученных результатов.

Глава 1 представляет Обзор литературы, включающий 37 страниц печатного текста, разделенного на 5 частей, где достаточно полно подняты и обсуждены основные вопросы антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий, вклад интегронов в формирование фенотипов антибиотикорезистентности, происхождение, структура и эволюция интегронов, вклад интегронов в эволюцию антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий, методы выявления интегронов в геномах бактерий. Обзор написан хорошим языком, очень четко, с привлечением данных 243 зарубежных и отечественных источников литературы.

В главе 2 описаны использованные в работе методы: микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические. Важной особенностью является описание биоэтических требований к использованию клинических изолятов, полученных от людей.

Раздел собственных исследований состоит из трех глав, в которых приведены основные результаты проведенных исследований.

Глава 3 посвящена детекции и идентификация интегронов классов 1 и 2 в клинических штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг. Представлены результаты фенотипической и генетической характеристики изолятов возбудителей госпитальных инфекций, оценки распространенности генных кассет интегронов классов 1 и 2 в изолятах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг. Особый интерес вызывает описание новых интегронных структур, выявленных в ходе исследования, а также филогенетический анализ генных кассет интегронов классов 1 и 2.

Важным практическим результатом исследования явилась разработка лабораторного образца мультиплексной ПЦР тест-системы в режиме реального времени для детекции генов интегронов классов 1 и 2.

Глава 4 описывает интегроны классов 1 и 2 в резистомах нозокомиальных патогенов, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2015 - 2019 гг., в том числе носительство генетических детерминант антибиотикорезистентности и множественно лекарственно устойчивых грамотрицательных бактерий у пациентов нейрореанимации. Автором подробно описаны резистомы клинических изолятов грамотрицательных бактерий группы ESKAPE, а также описан уникальный резистом штаммов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}* и *bla_{NDM}* одновременно.

Глава 5 посвящена изучению резистомов грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых людей, сотрудников микробиологической лаборатории. Диссертант описывает этапы исследования, начиная с формирования группы участников исследования, далее оценивает видовое разнообразие клинических изолятов бактерий, описывает фенотипы и генотипы

бактериальных изолятов, подробно описывает структуру интегронов классов 1 и 2, идентифицированных в геномах выделенных грамотрицательных бактерий, представляет случай выявления носительства гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1 у сотрудника микробиологической лаборатории.

В **Заключении** автор анализирует полученные экспериментальные данные, сопоставляя их с данными литературы, подводит итог выполненной работы, обозначает перспективы для дальнейших исследований.

Выводы соответствуют цели и задачам диссертации.

В разделе **Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования** автор указывает основные направления использования полученных результатов.

Содержание автореферата и его оформление соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в полной мере отражает основные положения диссертации.

Вопросы и замечания по работе:

Принципиальных замечаний при чтении диссертации не возникло. Отдельные незначительные фразеологические неточности не снижают ценности рецензируемой работы.

Заключение

Полученные данные в процессе выполнения диссертационной работы Кузиной Е.С. «Интегроны классов 1 и 2 в штаммах мультирезистентных грамотрицательных бактерий» вносят вклад в понимание роли интегронов классов 1 и 2 в формирование фенотипов множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий, возбудителей госпитальных инфекций; вклада носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности у госпитализированных пациентов и здоровых людей. Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой, в результате проведенных исследований, содержится решение научной задачи - получение новых знаний об интегронах классов 1 и 2 в составе резистомов клинических штаммов грамотрицательных

бактерий, что важно для оценки молекулярно-эпидемиологической ситуации и выбора оптимальной антибиотикотерапии в клинической медицине, а также представляют интерес для отрасли науки молекулярной микробиологии патогенных микроорганизмов.

Диссертационная работа «Интегроны классов 1 и 2 в штаммах мультирезистентных грамотрицательных бактерий» отвечает критериям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 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 кандидатским диссертациям, а ее автор Кузина Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией микробиологии и антибактериальной терапии
Федерального государственного автономного
учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр нейрохирургии
имени академика Н.Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
кандидат медицинских наук

Сухорукова Марина Витальевна

25.11.2022 г.

125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская улица, дом 16

Контактные данные:

Тел. 8 499 251 59 16

E.mail: sukhorukovamv@nsi.ru

Подпись Сухоруковой Марины Витальевны заверяю:

Начальник отдела кадров ФГАУ «НМИЦ Нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко»
Минздрава России

25.11.2022 г.



Баукина Галина Ивановна

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР НЕЙРОХИРУРГИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.Н. БУРДЕНКО"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

наименование организации

Форма по ОКУД
по ОКПО

Код
0301004
01897274

Номер документа	Дата составления
323-л	17.10.2022

**ПРИКАЗ
(распоряжение)
о переводе работника на другую работу**

	Дата
с	17.10.2022
по	

Перевести на другую работу

Сухорукову Марину Витальевну, кмн

Пржнее место работы	фамилия, имя, отчество лаборатория микробиологии и антибактериальной терапии
	структурное подразделение врач-бактериолог
	должность (специальность, профессия), разряд, класс (категория) квалификации соглашение сторон
Новое место работы	причина перевода лаборатория микробиологии и антибактериальной терапии
	структурное подразделение заведующий лабораторией микробиологии и антибактериальной терапии-врач-бактериолог
	должность (специальность, профессия), разряд, класс (категория) квалификации постоянно, на 1,0 ставку
	вид перевода (постоянно, временно) квалификационная категория

Установить из расчета на 1,0 ставку:
Должностной оклад 40000,00 рублей в месяц.
Выплаты компенсационного характера:
за работу с вредными и (или) опасными условиями труда 10,00% должностного оклада 4000,00 рублей в месяц;
Выплаты стимулирующего характера:
повышающий коэффициент к окладу за ученую степень 0,10 должностного оклада в размере 4000,00 рублей в месяц.

Основание: дополнительное соглашение от 14.10.2022 № 2502

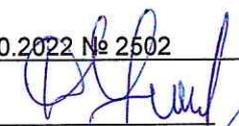
Директор

Согласовано:

Начальник отдела кадров

Главный бухгалтер

Начальник планово-эконом. отдела


личная подпись

личная подпись

личная подпись

Д.Ю.Усачев
расшифровка подписи
Г.И. Баукина
расшифровка подписи
Л.В. Каракаптан
расшифровка подписи
Т.А. Сухарева
расшифровка подписи

С приказом ознакомлена Сухоруков Сухорукова И.В.

В/о