

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Припутневич Татьяны Валерьевны на диссертационную работу Скрябина Юрия Павловича на тему «Молекулярная характеристика штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей токсикоинфекций, изолированных в разных регионах России», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### **Актуальность диссертационного исследования**

Золотистый стафилококк – один из ведущих возбудителей оппортунистических инфекций человека. Его роль в этиологической структуре инфекций в XXI веке не теряет своих позиций. Напротив, этот микроорганизм задает нам всё новые задачи, которые требуют быстрого решения – например появление метициллин-устойчивых форм стафилококка (MRSA). При этом оказалось, что MRSA не единственная проблема в этиологии стафилококковых инфекций. Установлено, что штаммы *Staphylococcus aureus* чувствительные к антибиотикам могут вызывать не менее опасные с точки зрения эпидемического распространения массовые заболевания, сопровождающиеся высокой летальностью. В первую очередь, это пищевые инфекции, при которых специфическая клиническая картина и патогенетические механизмы развития заболевания связаны с продукцией возбудителем энтеротоксинов, которые высоко устойчивы к факторам внешней среды и способны сохранять физиологическую активность в желудочно-кишечном тракте человека. Другой клинически значимой нозологической формой, вызываемой чувствительными к антибиотикам штаммами *Staphylococcus aureus*, является эксфолиативный дерматит, который чаще поражает новорожденных (болезнь ошпаренной кожи, или пузырчатка новорожденных), но может представлять смертельную опасность и для иммунокомпрометированных пациентов старшего возраста. Патогенетические механизмы развития заболевания в данном случае связаны с продукцией возбудителем эксфолиативного токсина.

Развитие молекулярно-генетических технологий позволяет в настоящее время изучать генетические основы факторов патогенности. За последнее десятилетие в Западной Европе, Японии выполнено много работ по генетической характеристике штаммов *Staphylococcus aureus*, способных вызывать пищевые инфекции и эксфолиативный дерматит. Было показано, что развитие заболеваний и тяжесть проявлений симптомов зависят от клонального комплекса и набора мобильных генетических элементов у

золотистых стафилококков, циркулирующих в том или ином географическом регионе.

В России практически отсутствуют работы о молекулярно-генетических характеристиках метициллин-чувствительных штаммов золотистого стафилококка (MSSA), в связи с чем эпидемиология пищевых стафилококковых инфекций и эксфолиативного дерматита в современных условиях в нашей стране остаётся не изученной.

Учитывая, что эпидемиологическая ситуация всегда конкретна и определяется особенностями возбудителя и коллектива зараженных в конкретных условиях социальной среды (что и определяет закономерности развития эпидемического процесса), знание молекулярно-генетических особенностей штаммов *Staphylococcus aureus*, циркулирующих на различных территориях РФ, представляется крайне необходимым для эффективной профилактики этих инфекций на современном этапе развития научных технологий.

Поэтому не вызывает сомнения актуальность проведенного Юрия Павловича Скрыбиным диссертационного исследования, целью которого были геномный и молекулярно-эпидемиологический анализ штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных при вспышках пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита новорожденных в период 2012 – 2018 годы в разных регионах России.

Не может вызвать возражения утверждение, что использование методов типирования возбудителей, основанных на молекулярно-генетическом анализе, является в настоящее время в РФ назревшей необходимостью и позволит поднять на качественно новый уровень эпидемиологическую диагностику, сократив время проведения маркировки штаммов, увеличив возможности стандартизации и воспроизводимости получаемых результатов.

#### **Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов**

Все результаты получены автором лично или при его непосредственном участии, включая сбор и анализ данных литературы в рамках темы, формулирования актуальности, цели, задач, планировании и постановке экспериментов, апробации использованных в работе технологий, обработке, анализе и интерпретации результатов исследования, их оформлению и публикации.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация имеет классическую структуру: изложена на 145 страницах компьютерного набора, иллюстрирована таблицами и рисунками, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования,

главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, рекомендаций по практическому использованию результатов исследования, перечня сокращений, списка цитированной литературы (включает 7 работ отечественных авторов и 227 работ зарубежных авторов) и списка опубликованных работ по теме диссертации.

Во введении автор убедительно аргументирует актуальность проводимого исследования, формулирует цель и задачи работы, её научную и практическую новизну, выдвигает положения, выносимые на защиту, приводит сведения по апробации результатов работы, перечень публикаций по теме исследования.

Обзор литературы состоит из пяти подразделов, в которых дана общая характеристика рода *Staphylococcus*, представлена фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика золотистого стафилококка, описаны методы генотипирования *S. aureus*, рассмотрены генетические особенности штаммов *S. aureus*, способных вызывать пищевую инфекцию и эксфолиативный дерматит. Особое внимание уделено мобильным генетическим элементам, в которых могут быть закодированы гены энтеротоксинов и эксфолиативных токсинов, обеспечивающих характерную клиническую картину пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита. Автор сумел лаконично и чётко изложить мировой опыт по этим вопросам, критически проанализировать представленные работы, показать особенности эпидемиологического плана, выявлять которые удастся только с помощью молекулярно-генетических методов. Обзор дает представление о современном состоянии проблемы и позволил соискателю убедительно обосновать необходимость генотипирования изолятов *S. aureus* при расследовании вспышек пищевой токсикоинфекции и эксфолиативного дерматита.

В главе «Материалы и методы» изложены методические приемы, оборудование и программы, с помощью которых были решены поставленные задачи. В работе было исследовано 515 штаммов *S. aureus*, изолированных во время вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита в 14 регионах РФ. Соискатель использовал как классические микробиологические, так и новейшие методы типирования микроорганизмов, в том числе ПЦР для определения генов вирулентности с использованием 30 специфических праймеров, провёл полногеномное секвенирование штаммов с определением их сиквенс типов тремя различными методами (MLST, Spa-, Coa-типирование), что позволило определить принадлежность штаммов к определенным клональным комплексам. Продукцию штаммами энтеротоксинов определяли с помощью иммуноферментного анализа. Для поиска факторов вирулентности в секвенированных геномах применён

биоинформатический анализ. Компьютерная программа Easyfig была использована для сравнительного анализа геномных последовательностей бактериофагов. Таким образом, автором проделана поистине титаническая работа. На современном методическом уровне выполнен обширный объём разнообразных исследований, сравнительный анализ которых позволил автору сделать выводы, достоверность которых не вызывает сомнения.

Глава диссертации, посвященная результатам собственных исследований, разделена на шесть подглав. В подглаве 3.1 рассмотрена существующая на данный момент нормативная документация по методам исследования штаммов *S. aureus*, обозначена проблема генотипирования. Представлен разработанный и апробированный автором алгоритм исследования, позволяющий в течение суток после выделения чистой культуры провести генотипирование, определить вероятность стафилококковой природы инфекции и сделать предположение об источнике пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита.

Подглавы 3.2 и 3.3 содержат результаты анализа 11 вспышек пищевой инфекции и 8 - эксфолиативного дерматита в 14 регионах России за период с 2012 по 2018 года. При изучении вспышек инфекций был использован разработанный автором алгоритм. Выявлены разные варианты соа-ПЦР-ПДРФ паттернов среди заболевших в каждой вспышке. Методом ПЦР был проведён поиск основных генов энтеротоксинов. Генетический анализ выделенных штаммов *S. aureus* показал, что наиболее масштабные вспышки пищевых инфекций (в трёх вспышках пострадали 575 человек, из которых 302 потребовали госпитализации) были связаны с централизованным снабжением пищей, обсеменённой энтеротоксин-продуцирующими штаммами *S. aureus*. Впервые были определены клональные комплексы штаммов *S. aureus*, вызвавших вспышки пищевых инфекций в РФ.

Изучение 303 изолятов *S. aureus*, выделенных во время 8 вспышек эксфолиативного дерматита, при которых пострадали 82 новорожденных, выявило штаммы, кодирующие один или два гена эксфолиативных токсинов.

Подглавы 3.4 и 3.5 включают информацию о полногеномном анализе штаммов *S. aureus*, являющихся возбудителями пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита. Приведены данные о филогенетическом положении геномов изучаемых штаммов *S. aureus* относительно геномов, опубликованных в базе данных GenBank. Большое внимание уделено профагам, в которых закодированы гены энтеротоксина А и эксфолиативного токсина А, наиболее часто встречающихся у штаммов *S. aureus* – возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита.

Автором показана высокая геномная изменчивость штаммов *S. aureus* СС30 и сравнительная однородность штаммов СС1. Филогенетический анализ геномных последовательностей бактериофагов показал различные эволюционные пути развития геномной структуры бактериофагов в разных клональных комплексах золотистого стафилококка.

В подглаве 3.6 описано создание коллекции штаммов *S. aureus*, выделенных при пищевой инфекции и эксфолиативном дерматите. В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk») депонировано 60 штаммов *S. aureus*, 14 из них предложены в качестве референсных штаммов *S. aureus*, как возбудители пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита с подробной характеристикой, в том числе на уровне полногеномной последовательности.

В разделе «Заключение» Ю.П. Скрыбин коротко резюмирует итоги, оставляя целостное впечатление о проведенных исследованиях и полученных результатах. Хотелось бы чтобы заключение было в стиле более активного обсуждения научной и практической значимости проведенного исследования. У автора были к тому все основания.

Выводы обоснованы, соответствуют поставленным задачам и являются логичным следствием анализа результатов проделанной автором работы. Их достоверность не вызывает сомнения.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендация, сформулированных в диссертации**

Обоснованность положений, выносимых на защиту, выводов по результатам проведенного исследования, а также выработанных на основании полученных результатов рекомендаций подтверждена большим объемом корректных экспериментальных данных, правильно проведенным теоретическим анализом избранной проблематики, и соответствием полученных результатов поставленным цели и задачам.

Диссертационная работа Скрыбин Ю.П. представляет завершённое исследование, выполненное на высоком методическом уровне. В ходе работе впервые в России получены сведения по молекулярно-генетической характеристике штаммов *S. aureus*, выделенных при вспышечной заболеваемости на различных территории России, отражены проблемы, связанные с генотипированием *S. aureus* в России и предложен новый подход, позволяющий решать данную проблему в практическом здравоохранении страны.

## **Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций**

Высокая степень достоверности, обоснованность полученных результатов и выводов диссертации основаны на использовании большого объёма фактического материала, использованием современных методов и сертифицированного оборудования.

Научные положения диссертации представлены на научных конференциях, материалы которых опубликованы в сборниках материалов конференций, а также в статьях, опубликованных в Российских и международных изданиях, индексируемых базами данных *Scopus* и *Web of Science*.

Автором впервые идентифицированы и охарактеризованы штаммы *S. aureus*, выделенные во время вспышек пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита в России.

Также в процессе выполнения работы впервые обнаружен феномен ЭТА-конверсии штамма *S. aureus* СС8, для которого установлен новый сиквенс-тип ST2993.

Установлена ассоциация между географической локализацией и клональным комплексом возбудителей эксфолиативного дерматита в России.

Впервые при вспышке пищевой инфекции были выявлены одновременно два варианта штамма *S. aureus*, отличающиеся наличием/отсутствием профага, кодирующего ген энтеротоксина А.

### **Практическая значимость результатов**

Практическая значимость диссертационной работы Ю.П. Скрябина заключается в разработке и апробации алгоритма исследования изолятов *S. aureus* при изучении случаев пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита; создании коллекции штаммов *S. aureus*, выделенных в 14 регионах России с 2012 по 2018 года; создании базы данных «Клинические штаммы *Staphylococcus aureus*, выделенные в центральном регионе России» (Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2019620329 от 27.02.2019 г.). В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск») депонировано 60 штаммов *S. aureus*, из которых 14 предложены в качестве референсных возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита в России. В международную базу GenBank депонировано 42 генома *S. aureus*, возбудителей пищевой инфекции и эксфолиативного дерматита.

### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе в целом**

Диссертация Скрябина Юрия Павловича на тему «Молекулярная характеристика штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей токсикоинфекций, изолированных в разных регионах России» по специальности 03.02.03 – микробиология, на соискание ученой степени кандидата биологических наук имеет очевидную практическую и научную ценность, а ее автор проявил себя в качестве состоявшегося квалифицированного исследователя. Теоретический и методический уровень, на котором выполнена работа, большой объем экспериментальных данных, комплексный анализ полученных результатов и содержательный иллюстративный материал делают научные положения, сформулированные в диссертации, обоснованными и аргументированными.

Принципиальных замечаний по существу работы нет.

В порядке дискуссии хотелось бы узнать мнение автора по поводу использования им термина «этиологические факторы инфекции». Автор использует эту дефиницию по отношению к комбинации генов, кодирующих факторы патогенности золотистого стафилококка (много раз в тексте диссертации, а также в выводах 2 и 4). В классической эпидемиологии термины «возбудитель», «этиологический фактор» - равнозначны и подразумевают микроорганизм, вызвавший инфекционный процесс. Что касается генов патогенности, то они кодируют продукцию возбудителем веществ (в данном случае токсинов), запускающих **патогенетические** механизмы течения инфекционного процесса, а этиологическим фактором или возбудителем инфекции является сам микроб. Совсем неприемлемым выглядит использование автором словосочетания «этиологические возбудители».

Сделанные замечания не меняют мнения о высоких достоинствах и принципиально положительной оценке выполненной диссертационной работе Ю.П.Скрябина, практическая реализация положений которой поможет поднять на новый качественный методический уровень эпидемиологическую диагностику стафилококковых инфекций в практическом здравоохранении.

Автореферат дает полное представление о содержании диссертационной работы. Приведенный список публикаций по теме диссертации, включает 26 печатных работ, 6 из которых опубликованы в Российских и международных изданиях, рекомендованных ВАК.

### Заключение

Диссертационная работа Скрябина Ю.П. на тему «Молекулярная характеристика штаммов *Staphylococcus aureus*, возбудителей токсикоинфекций, изолированных в разных регионах России», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является завершенной научно-квалификационной работой. Соответствие специальности 03.02.03 обосновано целью, задачами, методическими подходами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами исследования.

По актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Скрябина Ю.П. соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а автор работы Скрябин Юрий Павлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ

директор института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России),

доктор медицинских наук  Татьяна Валерьевна Припутневич

199034, г. Москва, ул. Академика Опарина, дом 4

Тел.: +7-(495)-438-25-10

e-mail: info@oparina4.ru

Подпись Припутневич Т.В. заверяю

Начальник отдела кадров

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»

Минздрава России



 Рыбаков Павел Павлович