

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора Федерального государственного
бюджетного учреждения «Детский научно-
клинический центр инфекционных болезней
Федерального медико-биологического агентства»
член корреспондент РАН, доктор мед. наук, профессор
К.В. Жданов



2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» на диссертационную работу Слукина Павла Владимировича «Фенотипические и молекулярно-генетические свойства уропатогенных штаммов *Escherichia coli*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Escherichia coli – широко распространенные возбудители кишечных, септических, респираторных и др. заболеваний, в том числе инфекции мочевыводящих путей. Среди штаммов уропатогенных *Escherichia coli* (UPEC) широко распространена устойчивость к антимикробным препаратам, в том числе антисептикам и дезинфектантам, которая связана не только с широким клиническим применением антибиотиков, но и с неконтролируемым использованием антимикробных препаратов при самолечении. В случае долговременной персистенции возбудителя в организме человека при хронических урологических заболеваниях у патогена отмечается накопление генетических детерминант резистентности с последующим формированием фенотипа множественной лекарственной устойчивости. Знание фенотипов и генотипов резистентности к антимикробным препаратам в популяции UPEC позволяет клиницистам прогнозировать дальнейшее развития антибиотикорезистентности и оптимизировать схемы лечения заболеваний.

Одним из свойств, позволяющих бактериям UPEC уклоняться от

воздействия антимикробных препаратов и факторов иммунной системы макроорганизма, является способность формировать биопленки на поверхности уротелия и мочевых конкрементов. При этом, использование в современной медицине имплантатов (катетеров, стентов, сфинктеров и др.) также усугубляет способность биопленкообразования бактериями UPEC.

E. coli, возбудители инфекций мочевыделительной системы, характеризуются наличием у них большого количества факторов патогенности: адгезинов, токсинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма. Идентификация наборов генетических детерминант факторов патогенности в штаммах UPEC позволяет предсказать патогенные свойства штаммов, их клиническую и эпидемиологическую значимость. Важным этапом изучения механизмов патогенеза таких штаммов представляется изучение корреляции наличия факторов вирулентности и их генетических детерминант с тяжестью инфекционного процесса на биологических моделях.

Общеизвестно, что бактерии вида *E. coli* обладают значительным фенотипическим и молекулярно-генетическим разнообразием, что приводит к необходимости их внутривидового типирования по биохимическим, серологическим и биологическим особенностям, а также по наличию генетических маркеров. Наиболее распространенными методами являются типирование по специфичным генам синтеза O-антигенов, филогенетический анализ по Clermont и мультилокусное сиквенс-типирование. На основании этих подходов определяется принадлежность штаммов к определенным генетическим группам. Показано, что распространенность генетических групп UPEC различается в разных географических регионах. На сегодняшний день, сведений о доминирующих генетических группах UPEC в Российской Федерации крайне недостаточно.

Поэтом диссертационная работа Слукина Павла Владимировича, посвященная изучению фенотипических и молекулярно-генетических свойств уропатогенных штаммов *E. coli*, выделенных от людей с инфекциями мочевыводящих путей в Российской Федерации в 2005-2020 гг., несомненно, актуальна.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Автором диссертационного исследования проведен анализ представительной коллекции из 303 клинических штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России в 2005-2020 гг., установлена принадлежность 45 % штаммов коллекции к широко распространенным в мире группам UPEC O25-B2-ST131, O75-B2-CC14, A-CC10, D-ST69, O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127, O2/O6-B2-ST73, D-ST405, O86-D-ST501, B1-ST58 и O89-A-ST744, что указывает на схожесть генетической структуры возбудителя UPEC в Российской Федерации и в других странах.

Выявлена высокая генетическая гетерогенность штаммов UPEC: определены 19 серогрупп, 25 сиквенс-типов и 21 генетическая группа. При этом, впервые штаммы UPEC отнесены к сиквенс-типам ST165, ST1140, ST1858, ST9239, ST10102 и ST12358; а также генетическим группам O4-F-ST12, O6-B2-ST1858, O8-B1-ST9239, O8-B1-ST297, O9-A-ST46, O11-F-ST457, O15-E-ST38, O17-E-ST69, O18-B2-ST14, O91-B1-ST1196 и O134-B2-ST569. Идентифицировано 3 новых сиквенс-типа *E. coli*: ST9239, ST10102 и ST12358.

В проведённом исследовании показано, что 20 % штаммов одновременно являлись мультирезистентными к антибиотикам (бета-лактамам, фторхинолонам и аминогликозидам) и устойчивыми к препаратам антисептиков/дезинфектантов (триклозану и бензалконию хлориду).

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Практическая и научная ценность работы Слукина Павла Владимировича заключается в расширении представления об этиологической структуре инфекций мочевыводящих путей, вызванных *E. coli*.

Создана коллекция штаммов *E. coli* (n=303), выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в Российской Федерации в 2005-2020 гг., разработаны и зарегистрированы в Госреестре три Базы данных: «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» (Свидетельство № 2017621413 от 01.12.2017 г.),

«Генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.» (Свидетельство № 2021621432 от 01.07.2021 г.) и «CRISPR-CAS системы бактерий III-IV групп патогенности» (Свидетельство № 2021621482 от 07.07.2021 г.), которые могут быть использованы другими исследователями.

Депонированные в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» 62 штамма UPEC могут быть использованы в дальнейших работах по изучению антибиотикорезистентности, вирулентности и биопленкообразования.

Автором разработаны и представлены методические рекомендации учрежденческого уровня «Оценка вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*» (Рассмотрены и одобрены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ, протокол № 4 от 10.09.2020 г.).

Результаты работы автора представлены на международном уровне: в международной базе данных GenBank размещены 28 нуклеотидных последовательностей генов вирулентности, антибиотикорезистентности и O-серогрупповой принадлежности, а также 54 полных генома штаммов UPEC; в Базу данных MLST Уорикского университета размещена информация о 21 штаммах *E. coli*, принадлежащих к 16 сиквенс-типам.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Диссертационное исследование Слукина П.В. базируется на обширном анализе литературных данных (270 литературных источников). Достоверность полученных результатов подтверждается проведением исследовательских работ современными методами, на поверенном оборудовании, в соответствии с международными рекомендациями. Для изучения клинических штаммов были использованы микробиологические, биохимические, биофизические, молекулярно-генетические, биоинформатические и биологические методы исследований. Обработку результатов проводили статистическими методами, анализ литературы и полученных результатов проводили формально-логическими методами.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Созданные автором диссертационного исследования коллекция штаммов UPEC, электронный каталог и Базы данных могут быть использованы для анализа фенотипических и генетических характеристик штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями. Нуклеотидные последовательности генов вирулентности, антибиотикорезистентности и O-серогрупповой принадлежности, а также полные геномы штаммов UPEC и информация о клинических изолятах, размещенные в базе данных MLST и GenBank, могут быть использованы исследователям во всем мире. Методические рекомендации учрежденческого уровня «Оценка вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*» могут быть использованы как основа для разработки методических рекомендаций федерального уровня.

Оценка структуры и содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из Введения, семи Глав, Заключения, Выводов, Рекомендаций по использованию диссертационного исследования, Перечня сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов, Списка использованных источников, Списка работ, опубликованных по теме диссертации и 7 Приложений. Текст диссертации содержит 28 таблиц и 35 рисунков. Библиографический указатель содержит 270 литературных источника, в том числе 41 публикацию отечественных и 229 зарубежных авторов.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность проблемы, показывает степень разработанности темы, формулирует цель и задачи, отражает научную новизну исследования, ее теоретическую и практическую значимость, описывает методологию и методы исследований. Далее в этом разделе автор формулирует Положения, выносимые на защиту, описывает степень достоверности и апробации результатов, указывает личное участие в получении результатов и количество опубликованных работ.

В Главе 1 «Обзор литературы» автор описывает современные опубликованные данные об уropатогенных *E. coli*, их клинической значимости, фенотипических особенностях, факторах вирулентности, о распространенности устойчивости к антимикробным препаратам, геномных исследованиях, внутривидовом типировании. Кроме того, в данной главе приведены данные по оценке вирулентности штаммов UPEC на животных моделях.

В Главе 2 «Материалы и методы» автор приводит подробную информацию об объектах исследования, используемых референс-штаммах, питательных средах, их компонентах и используемых реактивах. Подробно описаны микробиологические, молекулярно-генетические и биологические методы исследования со ссылками на первоисточники и нормативно-методические документы. Представлена информация о применяемых в диссертационном исследовании биоинформатических и статистических методах для анализа данных, в том числе используемые web-ресурсы и программное обеспечение, а также ссылки на референсные последовательности генов и геномов.

В Главе 3 «Коллекция клинических штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей» описаны источники выделения штаммов, их культурально-морфологические и ферментативные свойства. Показано разнообразие биохимических и культуральных свойств штаммов коллекции, наличие у них свойств колициногенности и гемолиза (32 и 27 % штаммов, соответственно), продемонстрирована широкая распространенность биопленкообразующих и курли-продуцирующих штаммов (79 и 73 %, соответственно). В Заключении по главе автор делает вывод о схожести фенотипических признаков штаммов *E. coli*, полученных из разных лечебных учреждений.

В Главе 4 «Генотипирование штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей» описана принадлежность штаммов изучаемой коллекции к O-серогруппам, филогруппам и сиквенс-типам. Идентифицировано 23 O-группы *E. coli*, 8 филогрупп и 31 сиквенс-тип 27 клональных комплексов. Показано что доминирующими являлись штаммы серогруппы O25 (37 % штаммов) филогруппы B2 (51 % штаммов), сиквенс-типа

ST131 (18 % из 61 охарактеризованных штаммов). Идентифицировано 3 новых сиквенс-типа - ST9239, ST12358 и ST10102, имеющих уникальные аллельные профили генов «домашнего хозяйства». Методом случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК (RAPD) показана генетическая гетерогенность штаммов серогрупп O2, O4, O6, O8, O9, O15, O18, O25 и O91, а также генетическая однородность штаммов серогрупп O11, O75, O86, O89, O101 и O102. Определена принадлежность штаммов коллекции к 26 генетическим группам, с доминированием группы O25-B2-ST131 (29 %). Сравнение полученных результатов с данными, опубликованными другими исследователями и представленными в международных базах данных, позволило сделать вывод о том, что в данном исследовании впервые для штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями, идентифицированы серогруппы O91, O100, O101, O106, O115 и O143, а также сиквенс-типы ST165, ST501, ST540, ST1140, ST1429, ST1434, ST1858 и ST5958. Кроме того, впервые для штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России, идентифицированы генетических группы O25-B2-ST131, O75-B2-CC14, A-CC10, O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127, B1-ST58, O89-A-ST744, D-ST69, O2/O6-B2-ST73.

В Главе 5 «Оценка вирулентности штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей» описана встречаемость в геномах штаммов изученной коллекции генов вирулентности уропатогенных *E. coli* и их сочетаний. Показана широкая распространенность генов адгезинов *fimH* и *yfcV*, токсина *usp*, факторов поглощения железа *fyuA*, *chuA* и *iutA*, а также факторов защиты от иммунитета макроорганизма *traT*, *ompT* и *kpsMTII*. В базу данных GenBank депонированы последовательности 14 генов, ассоциированных с вирулентностью UPEC. На основании сочетания групп факторов вирулентности предложена классификация генотипов вирулентности. Сделан вывод о возможности отнесения к патогруппе UPEC штаммов *E. coli* на основании наличия у них одновременно генов нескольких групп: адгезинов, токсинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунитета. Проведена оценка вирулентности штаммов коллекции на модели личинок *Galleria mellonella*. Идентифицированы штаммы, проявляющие высокую, среднюю и слабую вирулентность на данной модели. Представлены Методические

рекомендации учрежденческого уровня для оценки вирулентности штаммов III-IV групп патогенности на модели личинок *Galleria mellonella*.

В Главе 6 «Фенотипы и генотипы резистентности к антимикробным препаратам штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей» автор описывает чувствительность изучаемых штаммов коллекции к 7 антибиотикам 5 функциональных классов, применяемых для лечения урологических заболеваний. Показано, что 5 % штаммов *E. coli* обладали чувствительным S-фенотипом, 49 % – устойчивым R-фенотипом и 46 % – множественно устойчивым MDR-фенотипом. Кроме того, изучена чувствительность штаммов коллекции к трем дезинфицирующим препаратам. Показано, что 20 % штаммов коллекции одновременно являлись мультирезистентными к антибиотикам и устойчивыми к препаратам антисептиков/дезинфектантов. Описана чувствительность биопленочных культур к антимикробным препаратам, показано, что 90 % штаммов в форме биопленочных культур были устойчивы к большинству антибиотиков и использованным антисептикам/дезинфектантам. Описана встречаемость в геномах штаммов изученной коллекции эпидемически значимых генов антибиотикорезистентности и их сочетаний; наиболее распространенными оказались гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M}-типа, а также интегроны класса 1; в базу данных GenBank депонированы 5 генов резистентности. Описаны фенотипы и генотипы резистентности наиболее распространенных генетических групп UPEC. Показано, что штаммы группы O25-B2-ST131 часто ассоциированы с MDR-фенотипом, устойчивостью к бета-лактамам и ципрофлоксацину, а также с наличием у них генов *bla*_{CTX-M} и интегронов класса 1. В данной главе также представлены данные по оценке антибактериальных и антибиопленочных свойств наноструктурированных пленок TiCaPCON, которые рассматриваются в качестве перспективных материалов для изготовления урологических имплантов.

В Главе 7 «Полные геномы штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей» подробно описаны особенности геномов 11 штаммов генетической группы O25-B2-ST131 выделенных в разные периоды в разных лечебных учреждениях Российской Федерации. Показано, что данные штаммы характеризуются высокой степенью генетической близости, наличием

идентичных профагов, а также несут F-плазмиду IncFI-группы. Анализ встречаемости в геномах генов вирулентности и антибиотикорезистентности показал, что во всех штаммах группы O25-B2-ST131 присутствовали опероны синтеза фимбрии типа I, F9-фимбрии, Usp-токсина, энтеробактина, гемофора, иерсиниабактина и курли-волокон, а также гены адгезина *fdeC*. Показана высокая идентичность первичной нуклеотидной последовательности генов и оперонов вирулентности, включая межгенные области. В полных геномах 11 штаммов группы O25-B2-ST131 идентифицированы генетические детерминанты резистентности к бета-лактамам (n=26), сульфаниламидам (n=16), аминогликозидам (n=13), макролидам (n=7), тетрациклам (n=7) и фениколам (n=6) и четвертичным аммониевым соединениям (n=7). Идентифицированы кластеры генов, включающие гены резистентности к разным группам антибиотиков, эффлюксные насосы, а также интегронные кассеты. Кроме того, во всех полных геномах штаммов генетической группы O25-B2-ST131 идентифицирован кластер *intI1~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA*.

В разделе «**Заключение**» полученные данные обобщены и подведен итог проделанной работы. 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 24 печатных работы, из них 5 статей в отечественных и международных реферируемых научных журналах, 3 Базы данных, 5 статей в других изданиях и 11 тезисов устных и стендовых сообщений в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

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

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы Слукина Павла Владимировича нет. Однако, в процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы для обсуждения.

Определял ли автор принадлежность СТХ-М бета лактамаз к отдельным подгруппам?

Анализировал ли автор корреляцию наличия генов устойчивости отдельных изолятов к антимикробным препаратам и фенотипов чувствительности/устойчивости?

Можно ли отнести включенные в исследование изоляты к возбудителям внебольничных или госпитальных инфекций?

Были ли методические особенности постановки теста чувствительности к фосфомицину?

Следует также отметить, что автор использовал недостаточно широкий спектр антибиотиков для фенотипического тестирования. Данные о чувствительности изученных изолятов к карбапенемам, амикацину и ко-тримоксазолу представляли бы определенный интерес.

Заключение

Диссертационная работа Слукина Павла Владимировича на тему: «Фенотипические и молекулярно-генетические свойства уропатогенных штаммов *Escherichia coli*», 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 типированием и характеристикой уропатогенных *Escherichia coli*, 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 РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539,

от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Слукин Павел Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Отзыв на диссертацию Слукина П.В. обсужден на заседании Проблемной комиссии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (протокол № 9 от «16» ноября 2023 г.).

Заведующий научно-исследовательским отделом
медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Федерального медико-биологического агентства»,

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

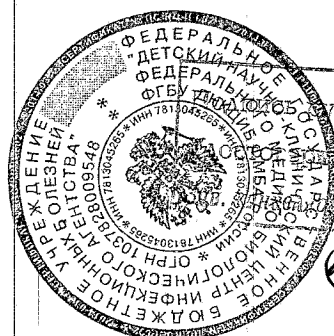
 С. В. Сидоренко

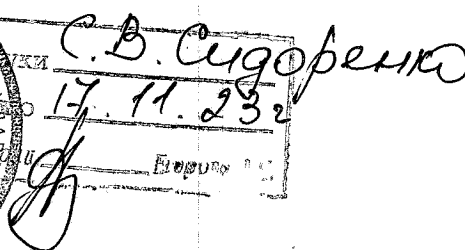
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»

197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9.

Телефон/факс: (812) 234-96-91

e-mail: niidi@niidi.ru




17.11.23
Борис