

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора медицинских наук Кафтыревой Лидии Алексеевны на диссертацию Слукина Павла Владимировича на тему: «Фенотипические и молекулярно-генетические свойства уропатогенных штаммов *Escherichia coli*» по специальности 1.5.11. «Микробиология» на соискание ученой степени кандидата биологических наук

### **Актуальность темы исследования**

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) относят к числу распространенных заболеваний, каждый год 150 млн человек испытывают хотя бы один эпизод ИМВП. Наиболее распространенным возбудителем этих инфекций являются *Escherichia coli* (уропатогенные *E. coli*, UPEC), которые вызывают не менее 50% всех случаев ИМВП. Часто инфекции подвержены дети, беременные женщины и лица пожилого возраста, а также пациенты с ослабленным иммунитетом, страдающие диабетом, мочекаменной болезнью и имеющие урологические импланты. При этом, у трети заболевших заболевание переходит в хроническую форму с неоднократными обострениями. Основным материалом для лабораторного исследования является проба мочи обследуемого пациента. Нередко, адекватный достоверный результат бактериологического анализа мочи на наличие штаммов UPEC затруднен из-за персистенции «уропатогенов», находящихся в «биопленочной» форме.

Одной из важных проблем терапии и профилактики заболеваний ИМВП, является широкое распространение штаммов UPEC, характеризующихся множественной резистентностью к антимикробным препаратам, что приводит к ограничению спектра доступных антибиотиков для лечения инфекций, увеличению сроков пребывания пациентов в лечебном учреждении и ухудшению прогноза заболевания. Особую тревогу вызывает распространение экстремально-резистентных штаммов, а также появление пан-резистентных штаммов возбудителей (UPEC).

В связи с вышеперечисленным актуальность диссертационной работы Слукина Павла Владимировича, посвященная изучению фенотипических и молекулярно-генетических свойств уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, не вызывает сомнений.

### **Достоверность исследования и полученных результатов**

Достоверность результатов диссертационной работы Слукина П.В. обеспечена проведением работ с использованием современных методов исследования, рекомендованных российским и международным научным сообществом. Положения и выводы диссертационного исследования основаны на адекватных статистических данных. Автор использовал широкий набор современных методов лабораторной

диагностики для изучения патогенного потенциала возбудителя: микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформатические, биологические и статистические.

Положения и выводы диссертационной работы обоснованы и соответствуют цели научного исследования, поставленным для ее достижения задачам. Положения, выносимые на защиту, и выводы имеют логическое подтверждение в тексте, иллюстрированы таблицами и рисунками. Каждое положение и вывод имеют смысловое и фактическое обоснование.

Рекомендации по использованию результатов диссертации лаконично и четко прописаны в соответствующем разделе работы, выполнимы и могут быть использованы специалистами разного профиля.

### **Научная новизна**

В ходе проведенного анализа выявлена высокая генетическая гетерогенность штаммов UPEC изученной коллекции; выявлены штаммы, принадлежащие к распространенным в мире генетическим 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). Впервые получены данные о штаммах UPEC, отнесенных к сиквенс-типам ST165, ST1140, ST1858, ST9239, ST10102 и ST12358, и 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.

Идентифицированы 3 новых сиквенс-типа *E. coli*: ST9239, ST10102 и ST12358, которые ранее не были представлены в мировой литературе как UPEC. Диссертант показал, что 20% штаммов UPEC с множественной резистентностью к антибиотикам имеют сочетанную устойчивость к антисептикам и дезинфектантам.

### **Значимость для науки и практики**

В результате проведенных исследований дополнены представления об этиологической структуре инфекции мочевыводящих путей, вызванных *E. coli*, созданы коллекция штаммов, электронный каталог и три Базы данных. Диссертантом разработана методика идентификации штаммов UPEC, на основе выявления генетических детерминант групп факторов вирулентности: адгезинов, факторов усвоения железа, токсинов и факторов защиты.

Интегративная оценка вирулентности проведена по модифицированной автором методике на лабораторной экспериментальной модели - личинках большой восковой моли *Galleria mellonella*.

В рамках диссертационной работы проведена оценка антибиопленочных свойств материалов, полученных в НИТУ «МИСиС», которые могут быть востребованы при разработке урологических имплантов.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 62 штамма UPEC; в Базе данных GenBank размещены 28 нуклеотидных последовательностей генов вирулентности, резистентности к антибиотикам и кодирующих специфичность O-антигенов, а также 54 полных геномов штаммов UPEC; в Базе данных MLST Уорикского университета опубликована информация о 21 штамме *E. coli*, принадлежащих к 16 сиквенс-типам.

Разработаны Методические рекомендации «Оценка вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*».

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 270 литературных ссылок, а также 7 приложений. Работа проиллюстрирована 28 таблицами и 35 рисунками.

Диссертационное исследование выполнено в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках 4-х отраслевых НИР Роспотребнадзора: «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» 2015-2020 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ 116030310007), «Молекулярно-генетические механизмы вирулентности и резистентности бактерий к антибактериальным препаратам» 2021-2025 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ 121022400056-5), «Исследование наночастиц с модифицированной поверхностью для разработки диагностических и иммунобиологических препаратов» 2016-2017 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ 116030310018) и «Исследование бактерицидной

активности наночастиц и наномодифицированных поверхностей» 2018-2020 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ АААА-А18-118011690119-0).

Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на десяти Российских и международных конференциях (2017-2023 гг.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 24 научных работы, в том числе 5 статей в отечественных и международных реферируемых научных журналах, 5 статей - в других изданиях, 11 тезисов устных и стендовых докладов в материалах научных конференций, три Базы данных.

### **Содержание диссертации, ее завершенность**

В разделе **«Введение»** автором обоснована актуальность исследования, приведена научная новизна, практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, описана степень достоверности, апробации результатов и количество опубликованных работ. Пять поставленных задач отражают цель и соответствуют положениям, выносимым на защиту.

В **Главе 1 «Обзор литературы»** проанализированы литературные источники, посвященные современным данным об уropатогенных *E. coli*, их клинической значимости, фенотипическим и генетическим особенностям, включая факторы вирулентности, устойчивость к антимикробным препаратам, описание генома, оценку вирулентности на экспериментальных моделях и внутривидовому типированию. Обзор основан на использовании большого объема научных источников.

В **Главе 2 «Материалы и методы»** изложена информация о методических приемах (микробиологические, молекулярно-генетические и биологические), с помощью которых были решены поставленные задачи. Подробно описаны объекты исследования, референс-штаммы, питательные среды, их компоненты и используемые реактивы. Приведена информация о применяемых биоинформатических и статистических методах анализа данных, в том числе используемые web-ресурсы и программное обеспечение, а также ссылки на референсные последовательности генов и геномов.

В пяти главах (3 – 7) изложены результаты собственных исследований, с помощью которых были решены поставленные задачи и получены результаты, отвечающие требованиям научной новизны и практической значимости.

**В Главе 3 «Коллекция клинических штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей»** охарактеризованы источники выделения штаммов их культурально-морфологические и ферментативные свойства. По результатам исследования сделано заключение о разнообразии фенотипов *E. coli* и о распространенности стабильных признаков, отражающих патогенные свойства штаммов: колициногенность, гемолиз эритроцитов, образование биопленок (встречаются у 32%, 27% и , 79%, соответственно). На основе статистического анализа показана идентичность встречаемости фенотипических признаков у штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов, проходивших лечение в разных лечебных учреждениях.

**В Главе 4 «Генотипирование штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей»** представлены результаты генотипирования на основе генов, ассоциированных с O-антигенами (серологической группой), принадлежности к филогруппам и сиквенс-типам. Показано генетическое разнообразие изученных штаммов: идентифицированы 23 серологические группы по гену, кодирующему O антиген, принадлежность к 8 филогруппам и к различным сиквенс-типам (31) 27 клональных комплексов. В базу данных GenBank депонированы 9 генов, ассоциированных с серологическими группами *E. coli*. Идентифицированы три сиквенс-типа ST9239, ST12358 и ST10102, не встречающиеся ранее в научной литературе, имеющие «уникальные» аллельные профили конституционных генов. Определена принадлежность штаммов коллекции к 26 генетическим группам, установлен доминирующий генотип O25-B2-ST131 (29 %), что соответствует результатам, полученным исследователями в России (Макарова М.А., 2021 г.), 71% штаммов принадлежали к генотипам 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»** изучена встречаемость в геномах штаммов генов вирулентности, ассоциированных с уропатогенными *E. coli* и их сочетаний. Показана высокая распространенность маркерных генов, ответственных за синтез адгезинов, токсинов и сидерофоров. В базе данных GenBank депонированы последовательности 14 генов вирулентности UPEC. На основании сочетания генов, сделан вывод о принадлежности к патогруппе UPEC, при наличии у них генов, кодирующих специфичные адгезины, токсины, факторы усвоения железа и факторы защиты. Проведена оценка интегративной вирулентности штаммов на

экспериментальной модели - личинки *Galleria mellonella*. На основании выживаемости личинок при инъекции бактерий в дозах  $10^6$  и  $10^7$  КОЕ/особь, сделан вывод о наличии у штаммов высоко-, средне- и слабовирулентного патогенного потенциала. Представлена информация о разработке Методических рекомендаций «учережденческого» уровня для оценки вирулентности бактерий 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» представлены результаты определения чувствительности к широко используемым в урологической практике антибактериальным препаратам пяти функциональных групп и к трем классам дезинфицирующих средств. Показано, что 49% штаммов *E. coli* характеризовались R-фенотипом (были устойчивы к 1 или более препаратам), из них 46% характеризовались фенотипом множественной резистентности. Полученные результаты согласуются с данными российских исследователей. Кроме того, автор показал, что 20% штаммов коллекции одновременно обладали MDR-фенотипом и устойчивостью к дезинфектантам, что подтверждает результаты многих исследователей о том, что мобильные генетические элементы (интегроны первого класса) содержат генные кассеты резистентности к антибиотикам и дезинфектантам (четвертично -аммонийным соединениям - ген *qac*). Полученные диссертантом результаты выявили идентичность *E. coli* по спектру антибиотикорезистентности штаммов, циркулирующих в разных лечебных учреждениях в Российской Федерации.

На модели «biofilm macrocolony» изучена чувствительность биопленочных культур к антимикробным препаратам. Выявлена высокая резистентность (90-100% штаммов) биопленочных культур к большинству антибиотиков и антисептикам/дезинфектантам, исключение составляет только фторхинолон (ципрофлоксацин), к которому были устойчивы 37 % штаммов коллекции. Представлены данные по оценке «антибиопленочных» свойств наноструктурированных пленок TiCaPCON, которые являются перспективным материалом для изготовления урологических имплантов.

Описана встречаемость в геномах штаммов изученной коллекции эпидемиологически значимых генов резистентности к антибиотикам, наиболее распространенными оказались гены бета-лактамазы *bla*<sub>CTX-M</sub> и интегроны 1 класса. В

базу данных GenBank депонированы пять генов резистентности. Описаны фенотипы и генотипы резистентности доминирующих генетических групп UPEC. Показано, что штаммы доминирующей генетической группы O25-B2-ST131 характеризовались MDR-фенотипом, с устойчивостью к бета-лактамам и ципрофлоксацину, а также наличием у них генов бета-лактамазы *bla*STX-M и интегронов класса 1. Полученные данные были аналогичны данным других исследователей из разных стран.

В Главе 7 «**Полные геномы штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей**» показан анализ полных нуклеотидных последовательностей геномов 54 штаммов изучаемой коллекции. На основании филогенетического анализа сделан вывод об обособленности штаммов генетической группы O25-B2-ST131 от штаммов других групп. Для 11 штаммов группы O25-B2-ST131, выделенных в разные периоды и в разных лечебных учреждениях России, показана высокая встречаемость F-плазмиды IncFI-группы, наличие идентичных профагов и оперонов синтеза факторов вирулентности: фимбрии типа I, F9-фимбрии, FdeC-адгезина, Usp-токсина, энтеробактина, гемофора, иерсиниабактина и курли-волокон. Показана высокая идентичность первичной нуклеотидной последовательности генов и оперонов вирулентности, включая межгенные области. Идентифицированы кластеры генов, включающие гены резистентности к разным группам антибиотиков, эффлюксные насосы, а также интегронные кассеты. При этом во всех геномах штаммов клональной группы O25-B2-ST131 выявлен единый (общий) кластер *intI1~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA*. Показана высокая идентичность геномов штаммов UPEC генетической группы O25-B2-ST131 из изучаемой коллекции и штаммов этой же генетической группы, выделенных в других странах.

В разделе «**Заключение**», полученные данные обобщены и подведен итог проделанной работы. Выводы, представленные автором, отражают результаты собственного исследования и соответствуют поставленным перед исследованием задачам.

#### **Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы**

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, выполнении большей части микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических и статистических исследований, анализе результатов, в подготовке материалов для публикаций, в

представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации, в нем представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимости, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

### **Вопросы для обсуждения:**

1. Какой минимальный набор генов вирулентности должен содержать штамм *Escherichia coli*, чтобы вызвать ИМВП, такие как пиелонефрит или цистит?
2. Как часто в настоящее время чувствительные к антибиотикам штаммы *Escherichia coli* вызывают ИМВП?
3. В какой пропорции штаммы *E. coli* ST131 (так называемый международный успешный клон пандемического распространения) характеризовались резистентностью к цефалоспорином 3-4 поколения и фторхинолонам?
4. Вы идентифицировали несколько генетических групп штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов в России. Как Вы можете объяснить наличие в генетических группах O4/O6-B2-ST127 и O2/O6-B2-ST73 – штаммов с разными O-антигенами (O4, O2, O6)?

### **Заключение**

Диссертация 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 диссертационной работе содержится решение актуальной задачи - оценки фенотипических и молекулярно-генетических свойств уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг., имеющей существенное значение для расширения представления об этиологической структуре инфекций мочевыводящих путей, вызванных *E. coli*, что важно для современной микробиологии и медицины. Диссертация соответствует

требованиям пп. 9-14 «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, 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. г. № 1786), предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор Слукин Павел Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

Заведующая отделом микробиологии, ведущий научный сотрудник группы эпидемиологии брюшного тифа Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д.14; телефон/факс +7(812) 644-63-50, e-mail:kaflidia@mail.ru

Доктор медицинских наук

Кафтырева Лидия Алексеевна

Подпись д.м.н. Кафтыревой Л.А. заверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: 8 (812) 233-20-92, e-mail: pasteur@pasteurorg.ru)

кандидат медицинских наук



Трифонова Галина Федоровна

14 ноября 2023 г.