

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата медицинских наук Сухоруковой Марины Витальевны по диссертационной работе Слукина Павла Владимировича на тему «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

Уропатогенные *Escherichia coli* (UPEC) вызывают до 90 % внебольничных инфекций мочевыводящих путей (ИМВП), и порядка 50 % госпитальных инфекций данной локализации. ИМВП, вызываемые *E. coli*, наиболее часто диагностируются у людей с ослабленным здоровьем, хроническими заболеваниями, младенцев и беременных женщин. Для бактерий вида *E. coli* характерна высокая генетическая пластичность и гетерогенность, что обуславливает высокий адаптационный потенциал этих микроорганизмов. Клетки штаммов UPEC способны использовать широкий спектр питательных субстратов, имеют различные механизмы защиты от факторов иммунитета макроорганизма, способны формировать персистирующие формы – биопленочную и внутриклеточную – что позволяет им выживать в стрессовых условиях мочевыводящих путей. Одним из механизмов подобной пластичности является возможность горизонтального переноса отдельных генов и генных комплексов посредством мобильных генетических элементов, в том числе плазмид и бактериофагов.

Клиническим проявлением высокого адаптивного потенциала UPEC можно считать широкое распространение штаммов, обладающих приобретенной устойчивостью к антимикробным препаратам. При этом, не менее трети описанных в разных исследованиях штаммов обладали фенотипом поли-экстремально- и пан-резистентности. В последние годы сообщается о распространении штаммов UPEC, не чувствительных к антисептическим и дезинфицирующим препаратам. Все вышесказанное являются причинами трудностей выбора адекватной терапии ИМВП и контроля возбудителя инфекции во внутрибольничной среде.

На этом основании, выбранное диссертантом направление исследования - изучение фенотипических и молекулярно-генетических свойств уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных в нескольких лечебных организациях Российской Федерации, безусловно актуально и представляет интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения. Автором была сформулирована адекватная цель и поставлены соответствующие задачи, для решения которых была разработана специфичная методология с использованием комплекса традиционных и современных методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформатических, биологических, формально-логических и статистических.

Научная новизна исследования состоит в том, что

- установлен факт принадлежности значительной части (45 %) из 303 проанализированных штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России в 2005-2020 гг., к широко 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;

- выявлена высокая генетическая гетерогенность штаммов UPEC: определены 19 серогрупп, 25 сиквенс-типов и 21 генетическая группа;

- идентифицировано 3 новых сиквенс-типа *E. coli*: ST9239, ST10102 и ST12358, идентифицированных по схеме Ahtman;

- впервые штаммы UPEC отнесены к сиквенс-типам ST165, ST1140, ST1858, ST9239, ST10102 и ST12358; а также к 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;

- выявлено, что 20 % штаммов *E. coli*, одновременно являлись полирезистентными к антибиотикам (бета-лактамам, фторхинолонам и аминогликозидам) и устойчивыми к препаратам антисептиков/дезинфектантов (триклозану и бензалконию хлориду).

Практическая значимость полученных данных подтверждается на международном, федеральном и учрежденческих уровнях внедрения:

- созданные в ходе исследования коллекция штаммов *E. coli* (n=303), электронный каталог и три Базы данных: «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» (RU2017621413 от 01.12.2017 г.), «Генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.» (№ 2021621432 от 01.07.2021 г.) и «CRISPR-CAS системы бактерий III-IV групп патогенности» (№ 2021621482 от 07.07.2021 г.) могут быть использованы другими исследователями – федеральный уровень внедрения.

- в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 62 штамма UPEC, охарактеризованных по O-групповой принадлежности, вирулентности, антибиотикорезистентности и биопленкообразованию – федеральный уровень внедрения.

- в Базу данных GenBank размещены 28 нуклеотидных последовательностей генов вирулентности, антибиотикорезистентности и O-серогрупповой принадлежности, а также 54 полных генома штаммов UPEC – международный уровень внедрения;

- в Базу данных MLST Уорикского университета размещена информация о 21 штамме *E. coli*, принадлежащих к 16 сиквенс-типам – международный уровень внедрения;

- Методические рекомендации «Оценка вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*» утверждены директором ФБУН ГНЦ ПМБ 10.09.2020 г. – учрежденческий уровень внедрения.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в рамках 4 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).

Степень достоверности, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается объемом проведенных исследований, использованием стандартных методов, а также апробацией результатов в виде 24 научных работ, в том числе 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.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа написана в классическом стиле, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, пять глав собственных исследований, а также заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, список работ, опубликованных по теме диссертации, семи приложений. Диссертация изложена на 162 страницах и проиллюстрирована 28 таблицами и 35 рисунками.

Во **Введении** автор обосновывает актуальность проведенного исследования, обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, формулирует положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает анализ большого количества литературных источников, посвященных современным данным о клинической значимости уропатогенных *E. coli*, их фенотипических особенностей, генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности, оценке уровней вирулентности на животных моделях, устойчивости к антимикробным препаратам, а также анализу геномов и внутривидовому типированию штаммов.

В **Главе 2** описаны использованные в работе материалы и применяемые методы, сгруппированные по разделам микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформатических, биологических и статистических методов.

Здесь же описаны использованные в работе референсные штаммы и последовательности генов и геномов, программы и веб-ресурсы, а также нормативные документы.

Основные результаты проведенных исследований представлены в пяти главах.

В **Главе 3** дана общая характеристика коллекции штаммов *E. coli*: приведены клинические данные, базовые фенотипические, культурально-морфологические и ферментативные свойства. Проведено сравнение встречаемости фенотипических свойств у штаммов, полученных из разных лечебных учреждений. В заключении главы результаты собственных исследований автор сравнил с результатами, опубликованными другими исследователями.

В **Главе 4** проанализированы результаты типирования штаммов *E. coli* по O-серогруппам, филогруппам и сиквенс-типам, при этом показано высокое генетическое разнообразие изученных штаммов. Идентифицировано 3 новых сиквенс-типа по схеме Ahtman: ST9239, ST12358 и ST10102. Определена принадлежность штаммов коллекции к 26 генетическим группам, при этом 29 % штаммов отнесены к группе O25-B2-ST131. Полученные данные о внутривидовой гетерогенности штаммов *E. coli*, в основном, соответствовали описанным в научной литературе, однако описаны и отличающиеся моменты.

В **Главе 5** проанализированы результаты идентификации генов вирулентности и их сочетаний в геномах уропатогенных *E. coli*. По результатам анализа сделано заключение об отнесении штаммов *E. coli* к патогруппе UPEC на основании наличия у них генов вирулентности, кодирующих факторы адгезии, токсинообразования, поглощения железа и защиты от иммунитета макроорганизма. Автором оценена вирулентность штаммов *E. coli* на личинках *Galleria mellonella*, представлена информация о разработке Методических рекомендаций учрежденческого уровня для оценки вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на данной животной модели.

В **Главе 6** проанализированы результаты оценки фенотипов резистентности к антибиотикам и дезинфектантам у изучаемых штаммов *E. coli*.

Показано, что 46 % штаммов обладали фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), при этом 20 % штаммов характеризовались не только МЛУ фенотипом, но и устойчивостью к дезинфектантам. В данной главе также проанализирована способность изучаемых штаммов к биопленкообразованию и чувствительность биопленок к антимикробным препаратам. Проанализирована встречаемость в геномах уропатогенных *E. coli* эпидемически значимых генов антибиотикорезистентности: бета-лактамаз и интегронов. Сделан вывод о совпадении в целом полученных данных с таковыми, опубликованными другими исследователями в Российской Федерации и за рубежом.

В **Главе 7** приведены результаты анализа полных геномов штаммов UPEC. Дана подробная оценка наличия в геномах мобильных генетических элементов, генов вирулентности и антибиотикорезистентности для наиболее распространенной генетической группы *E. coli* O25-B2-ST131.

В **Заключении** автор обобщил полученные данные и подвел итог проделанной работы. Сформулированные **Выводы** соответствуют цели и задачам диссертации.

В разделе **Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования** автор указывает основные направления возможного использования полученных результатов. Полученные в процессе выполнения диссертационной работы данные расширяют представление о свойствах ведущего возбудителя инфекций мочевыводящих путей – *E. coli*, что имеет важное значение для оценки молекулярно-эпидемиологической ситуации, выбора оптимальной стратегии при лечении ИМВП, и представляет интерес для молекулярной микробиологии патогенных микроорганизмов.

Содержание автореферата отражает основное содержание диссертации, а его оформление соответствует требованиям нормативных документов.

Вопросы и замечания по работе:

При анализе работы возникли следующие замечания и вопросы.

Замечания. Раздел 2.1. Микробиологические методы. Выделение бактерий из клинического материала. Использован нестандартизированный метод

микробиологического посева мочи (отличный от рекомендаций, содержащихся в методических документах разных лет).

2. Интерпретация результатов определения чувствительности проведена в соответствии с актуальными рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST Breakpoint tables v. 13.0, 2023 г.), в то же время при описании методики исследования автор ссылается на Методические указания 4.2.1890-04 (2004 г.).

Вопросы.

1. Глава 2. Материалы и методы. Какие формы антибактериальных препаратов использовались для определения МПК: химически чистые субстанции антибиотиков с известной активностью или лекарственные формы?

2. В главе 3 при описании источников выделения *E. coli* указано, что при исследовании 42 образцов мочи выделено и включено в исследование по 2 и более (до 5) изолятов *E. coli*. Означает ли это, что в исследование было включено несколько изолятов *E. coli*, выделенных из одного и того же образца? Если да, то проводилось ли в ходе исследования сравнение основных изучаемых характеристик у разных изолятов, выделенных из одного и того же образца (у одного пациента)?

3. Проводилась ли сравнительная оценка основных изучаемых характеристик изолятов *E. coli* в зависимости от диагноза (клинической формы заболевания) и типа инфекции по времени возникновения (внебольничная или нозокомиальная)?

Указанные замечания не носят принципиального характера, а возникшие по ходу ознакомления с работой вопросы подчеркивают ее значение для науки и практики.

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 рамках которой решена важная для микробиологии и клинической медицины задача молекулярно-генетической характеристики уропатогенных штаммов *E. coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.. 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. № 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:

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
23.11.2023 г.

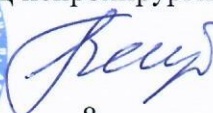


Сухорукова Марина Витальевна

125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская улица, дом 16
Тел. +7 499 972-86-68
E.mail: sukhorukovamv@nsi.ru

Подпись Сухоруковой Марины Витальевны заверяю:

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



Баукина Галина Ивановна