

## Отзыв

официального оппонента, доктора медицинских наук Багировой Наталии Сергеевны на диссертационную работу Егоровой Светланы Александровны на тему «Мониторинг чувствительности бактерий рода *Salmonella* к антибиотикам с учетом молекулярных механизмов резистентности», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

### **Актуальность темы исследования**

Актуальность избранной диссертантом темы не вызывает сомнений. Сальмонеллез занимает одно из ведущих мест в структуре острых кишечных бактериальных инфекций, характеризуется сложностью этиологической структуры, полиморфизмом клинических проявлений, возможностью генерализации инфекции. Актуальность проблемы сальмонеллезом определяется преимущественно пищевым путем инфицирования, который создает высокую вероятность возникновения массовых заболеваний в случае несоблюдения санитарно-гигиенических правил при работе с пищевыми продуктами животного происхождения. Тенденция к росту устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, составляющая глобальную проблему для здравоохранения во всем мире, отмечена и у бактерий рода *Salmonella*. Штаммы сальмонелл, устойчивые к антибиотикам, которые применяют для лечения сальмонеллезных инфекций (цефалоспорином и фторхинолоном), по определению ВОЗ, входят в число приоритетных возбудителей и требуют немедленной разработки новых подходов к терапии. Формирование устойчивости у возбудителей инфекций, общих для человека и животных, обусловлено в первую очередь широким использованием антибиотиков в сельском хозяйстве и птицеводстве, поэтому стратегия сдерживания резистентности в популяции сальмонелл должна опираться на интегративный мониторинг чувствительности штаммов, выделенных от людей, сельскохозяйственных животных и птиц, пищевых продуктов.

Работа, выполненная Егоровой Светланой Александровной, является масштабным исследованием, направленным на совершенствование микробиологического мониторинга чувствительности сальмонелл к антибиотикам путем повышения достоверности лабораторной диагностики и изучения молекулярных механизмов клинически значимой резистентности, и представляется весьма актуальной и своевременной.

### ***Научная новизна***

В результате многолетних исследований на большом количестве штаммов автором получены новые данные о чувствительности сальмонелл, выделенных в РФ, к широкому спектру антибиотиков. Изучена активность 23 антимикробных препаратов, принадлежащих к 13 классам. Показан значительный в последние годы рост резистентности сальмонелл к фторхинолонам, что отличает Российскую Федерацию от европейских стран и США, где устойчивые штаммы выделяют в 5-10 раз реже.

Следует отметить, что автор оценил уровни чувствительности сальмонелл не только к используемым в настоящее время антибиотикам, но и к препаратам, которые могут остаться единственными препаратами выбора в условиях нарастания множественной резистентности возбудителей – карбапенемам, колистину и тигециклину, чем существенно дополнил имеющуюся характеристику глобальной популяции сальмонелл, представленную Европейским комитетом по определению чувствительности микроорганизмов (EUCAST).

В работе впервые дана всесторонняя характеристика возбудителя брюшного тифа, выделенного на 21 административной территории Российской Федерации в последние пятнадцать лет, которая включила оценку филогенетической структуры возбудителя и уровней чувствительности к широкому спектру антибиотиков.

Автором получены новые данные о механизмах резистентности сальмонелл к бета-лактамам антибиотикам и хинолонам, которые наиболее

широко используют при лечении сальмонеллезных инфекций. Установлена циркуляция в Российской Федерации штаммов сальмонелл, продуцирующих бета-лактамазы генетических семейств TEM, CTX-M и CMY-2. Установлен ведущий хромосомный механизм устойчивости сальмонелл к хинолонам и выявлены семь вариантов однонуклеотидных замен в генах *gyrA* и *parC* (патенты на изобретение РФ № 2707548 от 27.11.2019, № 2707925 от 02.12.2019).

Автор впервые показал, что сальмонеллезная инфекция на территории нашей страны может быть вызвана штаммами сальмонелл, принадлежащими к международным клонам высокого риска с множественной резистентностью к антибиотикам, что подтверждает настоятельную необходимость участия Российской Федерации в международных программах по противостоянию росту и распространению резистентности к антибиотикам.

***Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации***

Достоверность результатов диссертационной работы Егоровой С.А. не вызывает сомнений и обеспечивается проведением исследовательских работ с использованием новейших методологических подходов, базирующихся на анализе современной научной литературы; использованием широкого спектра современных микробиологических и молекулярных методов исследования, биоинформатических алгоритмов и международных веб-платформ; объемом и репрезентативностью исследований (более 1000 штаммов *Salmonella* различных сероваров, выделенных в течение последних шести лет), оценкой данных в динамике (сравнение временных периодов 2002-2005 гг. и 2014-2019 гг.), полнотой охвата изученной популяции возбудителя брюшного тифа (штаммы, выделенные на различных административных территориях РФ в 2005-2019 гг., как при спорадических, так и при групповых заболеваниях брюшным тифом). Фактический материал проанализирован с использованием адекватных методов статистической

обработки количественных показателей, что подтверждает значимость и достоверность полученных результатов.

Автором были в полной мере решены поставленные задачи, соответствующие означенной цели, что отражено в обоснованных выводах исследования. Полученные результаты согласуются с современной научной литературой в данной области, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов. Представленные в диссертационной работе научные положения, выводы и практические рекомендации четко и ясно сформулированы, логически вытекают из результатов исследований, проведенных автором.

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Автором получена и структурирована важная информация о биологических свойствах бактерий рода *Salmonella*, включая чувствительность к антибиотикам, механизмы резистентности и филогенетическую характеристику, что имеет значение для совершенствования микробиологического мониторинга сальмонеллезов. Полученные автором сведения о том, что заболевания сальмонеллезами в Российской Федерации в последние годы вызывают штаммы, устойчивые к фторхинолонам, позволяют прогнозировать клиническую неэффективность препаратов этого класса при эмпирической терапии, доказывают необходимость обязательного определения чувствительности у выделенных штаммов сальмонелл с целью коррекции проводимой терапии.

Диссертационная работа имеет большую практическую значимость для совершенствования лабораторной диагностики клинически значимой резистентности у штаммов сальмонелл в рутинной практике. Автором разработаны эффективные алгоритмы фенотипического выявления устойчивости к цефалоспорином и фторхинолонам, которые позволяют получить достоверную информацию, необходимую для выбора адекватных эффективных антибиотиков для лечения сальмонеллезных инфекций. Эти

методологические подходы внедрены в работу бактериологических лабораторий инфекционных стационаров для взрослых и детей в городе Санкт-Петербурге: ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина», ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 5 им. Н. Ф. Филатова», ГБУЗ «Детская городская больница № 17 Святителя Николая Чудотворца».

Созданные автором базы данных, содержащие характеристику штаммов сальмонелл, выделенных в Российской Федерации, включая уровни чувствительности к различным антибиотикам, могут быть основой для коррекции существующих протоколов лечения сальмонеллезных инфекций.

### ***Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях***

Результаты исследований доложены и обсуждены на 11 конгрессах и конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. Основное содержание работы достаточно полно отражено в 45 печатных работах, в том числе в 14 статьях в рецензируемых изданиях. Получено два патента на изобретение и три свидетельства о регистрации базы данных. Материалы диссертации учтены при разработке трех методических и клинических рекомендаций, учебно-методического пособия, вошли в два аналитических обзора.

### ***Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации***

Автор качественно оформил и проиллюстрировал свою диссертацию с учетом современных требований, работа содержит все необходимые разделы. Диссертационная работа Егоровой С.А. изложена по традиционному плану на 292 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, 7 глав собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы и 8 приложений. Диссертация

содержит 33 таблицы и проиллюстрирована 54 рисунками. В списке литературы приведены 348 источников, из которых 277 иностранных. Более половины источников опубликованы в последние 5 лет.

В разделе «**Введение**» автором обоснована актуальность исследования и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту, описан личный вклад автора в выполнение исследования, обоснована достоверность результатов. В подразделе «**Материалы и методы**» подробно описаны использованные в работе методики проведенных исследований – микробиологические (изучение культуральных свойств, идентификация, определение чувствительности к антибиотикам), молекулярные, биоинформатические и статистические методы, а также программное обеспечение и веб-платформы, использованные в работе. Показан объем исследований, проведенных на различных этапах работы. Материалы этого подраздела показывают широкий диапазон современных экспериментальных методик, освоенных автором диссертации.

**Обзор литературы** включает анализ отечественных и иностранных научных публикаций, посвященных теме исследования. Автор представил современные данные о бактериях рода *Salmonella*, касающиеся сероваров, доминирующих в разных странах, а также показателей устойчивости к различным классам антибиотиков, подробно охарактеризовал механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам, представил полную характеристику глобальной популяции возбудителя брюшного тифа по чувствительности к антибиотикам и филогенетической структуре. Наиболее значимая информация представлена в шести сводных таблицах и двух рисунках. Обзор основан на анализе научных публикаций в ведущих отечественных и зарубежных журналах, представленных специалистами, авторитетными в вопросах изучения сальмонеллезных инфекций и антибиотикорезистентности.

**Результаты собственных исследований** представлены 7 главами.

**Глава 2** посвящена характеристике штаммов *Salmonella* «нетифоидных» сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг.: описана серотиповая структура 746 штаммов *Salmonella*, которая представлена 41 сероваром, причем доминирующее положение принадлежало серовару *S. Enteritidis*, доля которого в исследуемой популяции в разные годы колебалась незначительно и в среднем составила 79,6%. Интересно, что среди 51 штамма *S. Typhimurium* не было выявлено штаммов «монофазного» варианта  $\underline{1},4,[5],12:i:-$ , широко распространенного в европейских странах. Во второй главе также приведен анализ чувствительности штаммов различных сероваров к 13 классам антибиотиков, и особенно привлекают данные по уровню чувствительности к клинически значимым препаратам. При анализе устойчивости *Salmonella* к отдельным классам АМП обращает на себя внимание высокая частота устойчивости к хинолонам (ципрофлоксацину) – 60,9%, которая наиболее выражена у штаммов сероваров *S. Enteritidis* (68,7%) и *S. Infantis* (89,3%). В отношении устойчивости к другим антимикробным препаратам автор отмечает выраженные различия в зависимости от серовара.

**В третьей главе** представлены результаты изучения чувствительности к антибиотикам штаммов возбудителя брюшного тифа *S. Typhi*, выделенных в 2005-2019 гг. в РФ, приведены уровни чувствительности к клинически значимым антибиотикам, которые использовали ранее и в настоящее время для лечения брюшного тифа, описаны фенотипы устойчивости возбудителя.

**В четвертой главе** автор приводит результаты изучения устойчивости штаммов *Salmonella* к бета-лактамам антибиотикам с использованием фенотипических и молекулярных методов. Светлана Александровна оптимизировала алгоритм фенотипического выявления устойчивости к цефалоспорином расширенного спектра и дала оценку его диагностической ценности при дифференциации различных бета-лактамаз. Описаны бета-

лактамазы, обуславливающие устойчивость к бета-лактамам различных групп, мобильные генетические элементы, ассоциированные с бета-лактамазами. Охарактеризован штамм *S. Newport* MDR-AmpC, принадлежащий к международному резистентному клону высокого риска. Установлено, что плазида российского штамма *S. Newport* имела рестрикционный профиль R1 – один из наиболее распространенных у штаммов международного полирезистентного клона *S. Newport* MDR-AmpC/CMY-2. Таким образом, в ходе этого исследования выявлен факт завоза штамма международного полирезистентного клона на территорию РФ из стран Европы или США. Кроме того, в главе 4 дана полная фенотипическая характеристика штаммов, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра, по чувствительности к различным бета-лактамам и не-лактамам препаратам, и показано соответствие фенотипа молекулярному механизму резистентности.

В пятой главе изложены различные методические подходы к фенотипическому выявлению резистентности штаммов *Salmonella* к хинолонам и проведена их сравнительная оценка. На рисунке 25 представлен разработанный автором и научно-обоснованный алгоритм скрининга штаммов *Salmonella*, устойчивых к хинолонам, диско-диффузионным методом. Разработанный алгоритм можно также назвать сильной стороной данной диссертации, его легко внедрить в повседневную практику всех микробиологических лабораторий разного уровня материально-технической оснащённости. Штаммы, у которых был выявлен плазмидо-опосредованный механизм устойчивости (белок QnrS), характеризовались «парадоксальным» фенотипом резистентности (чувствительностью к налидиксовой кислоте и устойчивостью низкого уровня к цiproфлоксацину), и также достоверно выявлялись при использовании алгоритма комбинированного исследования: зона подавления роста для диска налидиксовой кислоты более 20 мм (S), пефлоксацина – менее 24 мм (R); МПК цiproфлоксацина 0,12-0,25 мг/л (R). Использование при скрининге дополнительного индикаторного хинолона – налидиксовой кислоты – позволило получить достоверный результат даже в



случае сомнительных результатов тестирования препаратов, рекомендованных нормативными документами (пифлоксацина и ципрофлоксацина). При условии использования описанного алгоритма комбинированного исследования (скрининг ДДМ с пифлоксацином и налидиксовой кислотой и определение МПК ципрофлоксацина) фенотипическая характеристика устойчивых к хинолонам штаммов *Salmonella* полностью соответствовала молекулярному механизму резистентности. В главе 5 особое внимание уделено устойчивости низкого уровня к фторхинолонам, имеющей большое клиническое значение, выявление которой вызывает наибольшие трудности в рутинной практике бактериологических лабораторий.

**В главе 6** представлены данные молекулярных методов исследования, дающие представление о хромосомных и плазмидных механизмах устойчивости к хинолонам, выявленные автором у штаммов *Salmonella*. Показана зависимость фенотипа резистентности и уровней устойчивости к индикаторным препаратам от молекулярного механизма резистентности. Описаны варианты и сочетания однонуклеотидных замен в хромосомных генах *gyrA* и *parC* у штаммов с различными уровнями устойчивости к фторхинолонам. Охарактеризован высокоустойчивый штамм *S. Kentucky ST198*, принадлежащий к международному резистентному клону высокого риска.

**В главе 7** автор описал комбинированные механизмы (хромосомные и плазмидные) множественной устойчивости, обнаруженные у штаммов возбудителя брюшного тифа в Российской Федерации, к антибиотикам, которые использовали в различное время для лечения брюшного тифа. Также в главе приведен перечень препаратов, рекомендуемый для проведения мониторинга чувствительности сальмонелл к антибиотикам.

**Глава 8** посвящена результатам филогенетического исследования штаммов возбудителя брюшного тифа несколькими международными стандартизированными молекулярными методами: пульс-гель-электрофорез, мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) и SNP-типирование.

Биоинформатическая обработка данных полногеномного секвенирования и использование международных баз данных позволило автору определить положение российских штаммов *S. Typhi* в глобальной популяции возбудителя брюшного тифа, что отражено на построенном филогенетическом древе. Установлено доминирование в РФ штаммов «азиатского» клона – субклады 4.3.1 (гаплотипа H58), который подробно охарактеризован в данной главе. Результаты генотипирования, полученные различными методами, представлены в виде информативной сводной таблицы, что позволяет провести их сравнительную оценку.

В разделе **«Обсуждение результатов»** автор продемонстрировал способность к вдумчивому и глубокому сравнительному анализу собственных результатов исследования и данных литературных источников. Структура и логика изложения материалов диссертации выглядят достаточно обоснованными в контексте раскрытия поставленной цели и задач исследования. Цели и задачи исследования, сформулированные автором, были вполне достигнуты. Работа написана логично, доказательно, ясным и строгим научным языком. Выводы диссертационного исследования Егоровой С.А. логично вытекают из результатов проведенного исследования и полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Диссертация представляет определенный интерес не только для научного сообщества, но и для врачей-микробиологов, и для специалистов эпидемиологической службы, и для клиницистов.

В разделе **«Практические рекомендации»** дано семь предложений по улучшению лабораторной диагностики клинически значимой антибиотикорезистентности у штаммов сальмонелл и экспертной оценки результатов.

Определены перспективы дальнейшей разработки темы.

Таким образом, диссертационная работа Егоровой Светланы Александровны является завершенным научным исследованием, обладающим научной новизной, теоретической и практической значимостью.

### **Соответствие специальности**

По тематике, методам исследования, предложенным научным положениям и выводам диссертационная работа Егоровой С.А. соответствует паспорту специальности научных работников 03.02.03 – микробиология (медицинские науки) и области исследования: пункты 1 – «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 2 – «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 – «Морфология физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне». Принципиальных замечаний по диссертации нет.

### **Вопросы к автору:**

1. Рост резистентности к карбапенемам среди нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий отмечается во всем мире. Гены, кодирующие карбапенемазы, входят в состав мобильных генетических элементов (плазмиды, транспозоны), что способствует их быстрому распространению в госпитальной среде. В диссертационной работе Светланы Александровны штаммы *Salmonella*, устойчивые к карбапенемам (ввиду различных механизмов развития резистентности) вообще не регистрировались. Интересно было бы узнать мнение автора, почему сложилась такая ситуация?

2. На рисунке 13 представлена динамика заболеваний брюшным тифом в РФ с 1971 по 2018 гг. (число случаев). Весьма интересный рисунок. С начала 70х годов и до конца 90х наблюдается неуклонное снижение случаев брюшного тифа в нашей стране. И в последние годы показатели заболеваемости брюшным тифом в РФ не превышали 0,03-0,1 на 100 тыс. населения. Светлана Александровна, пожалуйста, прокомментируйте эту картину, почему в 1971 году столь высокие показатели и почему число случаев брюшного тифа резко пошло на убыль в последние годы, несмотря на миграцию населения (туризм, трудовые мигранты), активизацию

международной торговли в нашей стране так редко регистрируют это заболевание?

3. Тестирование чувствительности к антимикробным препаратам проводили разными методами: диско-диффузионным методом и методами определения МПК: методом градиентной диффузии и с использованием коммерческих тест систем MIKROLATEST® SensiLaTest MIC GI и GII (ErbaMannheim) и Sensititre (ThermoScientific) (колистин, тигециклин). Эффективность использования различных методов тестирования чувствительности по сравнению с референсным методом микроразведений весьма варьирует. По Вашему мнению, допустимо сравнение результатов тестирования, полученных разными методами?

4. Чем можно объяснить более высокую множественную резистентность к антибиотикам у сальмонелл сероваров *Salmonella* Infantis (67,9%) и *Salmonella* Typhimurium (21,6%) по сравнению с сероваром *Salmonella* Enteritidis (7%), доминирующим в этиологической структуре сальмонеллезов в РФ?

### Заключение

Диссертационная работа Светланы Александровны Егоровой на тему «Мониторинг чувствительности бактерий рода *Salmonella* к антибиотикам с учетом молекулярных механизмов резистентности» является законченным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы совершенствования микробиологического мониторинга сальмонеллезов с позиций характеристики чувствительности и молекулярных механизмов устойчивости к клинически значимым антибиотикам, имеющей важное значение для медицинской микробиологии. Диссертационная работа Светланы Александровны Егоровой, представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология по

актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор Светлана Александровна Егорова заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

### Официальный оппонент

Старший научный сотрудник микробиологической лаборатории Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 23; тел.: +7 (499) 324-18-60; E-mail: nbagirova@mail.ru

доктор медицинских наук



Багирова Наталия Сергеевна

Подпись доктора медицинских наук  
Багировой Наталии Сергеевны заверяю

Ученый секретарь Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

кандидат медицинских наук




Кубасова Ирина Юрьевна

17.12.2020 г.