

Отзыв

**официального оппонента доктора медицинских наук
Припутневич Татьяны Валерьевны 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

К настоящему времени за рубежом и в Российской Федерации проведены многочисленные исследования в области антибиотикорезистентности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). В тоже время в Российской Федерации недостаточно освещена проблема резистентности возбудителей инфекций, общих для человека и животных, к которым относятся сальмонеллы. Несмотря на то, что большинство лабораторий используют в работе актуальные версии российских клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 года, не отменены методические указания МУК 4.2.1890-04, в которых категорически устарели критерии интерпретации результатов чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Критерии оценки для многих комбинаций микроорганизм/антибиотик многократно менялись в последние годы, это коснулось в том числе и тестирования препаратов, используемых для лечения сальмонеллезов. Большинство российских исследований выполнены диско-диффузионным методом, что не позволяет количественно охарактеризовать уровни минимальных подавляющих концентраций (МПК) антимикробных препаратов в отношении штаммов сальмонелл. Практически не изучены МПК многих антибиотиков, традиционно используемых для лечения сальмонеллезных инфекций (нитрофураны, цефалоспорины, хинолоны) или введенных в протоколы лечения относительно недавно (азитромицин). В условиях растущей резистентности микроорганизмов к антибиотикам, включая сальмонеллы,

которые сегодня внесены ВОЗ в список «приоритетных патогенов», представляет интерес оценка чувствительности полирезистентных штаммов к антибиотикам, которые в критической ситуации могут оказаться «препаратами последнего выбора» – карбапенемам, колистину, тигециклину.

Все вышесказанное значительно затрудняет проведение мониторинга чувствительности к антибиотикам сальмонелл, выделенных на различных территориях Российской Федерации, а также не позволяет сравнивать данные, полученные в разные годы российскими и зарубежными исследователями. Очевидно, что в настоящее время мониторинг чувствительности возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе и ИСМП, должен проводиться надежными стандартизированными методами микробиологической и молекулярно-генетической диагностики клинически значимых механизмов резистентности, опираясь на единые подходы к тестированию и интерпретации. В этих условиях актуальной задачей является разработка и внедрение в практику современных российских рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. В связи с чем диссертационная работа Егоровой Светланы Александровны, направленная на решение актуальной научной и практической задачи по совершенствованию мониторинга чувствительности сальмонелл к антибиотикам, опираясь на стандартизованные референтные методы тестирования, гармонизированные критерии оценки, молекулярно-генетические методы детекции механизмов резистентности, является актуальной и своевременной.

Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что в результате исследования большого числа штаммов автором получены новые обширные сведения об активности современных антибиотиков в отношении клинических штаммов сальмонелл, выделенных в Российской Федерации. Использование разработанных автором алгоритмов комплексной

лабораторной диагностики антибиотикорезистентности и экспертной оценки получаемых результатов позволило установить высокий уровень устойчивости к хинолонам, а также выявить его значительный рост у возбудителей сальмонеллезов и брюшного тифа в последние годы в Российской Федерации. Впервые оценен уровень чувствительности сальмонелл к препаратам резерва – карбапенемам, колистину и тигециклину, в настоящее время активно используемым для лечения ИСМП, которые могут быть востребованы для лечения генерализованных сальмонеллезных инфекций, вызванных полирезистентными штаммами возбудителя. Получено свидетельство о регистрации базы данных «*Salmonella*-Museum: антибиотикочувствительность и механизмы резистентности» (№ 2019622278).

Автор впервые количественно, с оценкой значений МПК, оценил активность «традиционных» и современных антибиотиков, использующихся для лечения брюшного тифа, и оценил филогенетическую структуру репрезентативной выборки штаммов возбудителя, завезенных за последние 15 лет на территорию Российской Федерации. Получены свидетельства о регистрации двух баз данных «*S. Typhi*-Museum: биологические свойства возбудителя брюшного тифа» (№ 2019621507) и «*S. Typhi*-Museum: молекулярные детерминанты резистентности» (№ 2020620406).

В ходе работы получены новые данные о хромосомных и плазмидных механизмах устойчивости сальмонелл к бета-лактамам и хинолонам: выявлена продукция бета-лактамаз расширенного спектра (генетических семейств TEM, CTX-M) и цефалоспоринов молекулярного класса C (CMY-2); охарактеризованы мутации в хромосомных генах *gyrA* и *parC*, обуславливающие устойчивость к хинолонам. На два штамма *Salmonella Typhi*, охарактеризованных фенотипическими и молекулярно-генетическими методами, обладающих однонуклеотидными заменами Ser83Phe, Ser83Tyr и Asp87Asn в гене *gyrA*, ранее не описанными в Российской Федерации, получены патенты на изобретение РФ (№ 2707548, 2707925).

Тридцать три штамма *Salmonella* с различными механизмами резистентности депонированы в Государственной коллекции патогенных

микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» как контрольные штаммы для проведения фенотипических и молекулярно-генетических исследований устойчивости к антимикробным препаратам (B-7744, B-8314, B-8452, B-8453, B-8463, B-8464, B-8654, B-8655, B-8861-B8868, B-9042-9058). В международном банке данных GenBank депонированы семь нуклеотидных последовательностей генов *gyrA*, *parC* и *gyrB* штаммов *Salmonella* с различными хромосомными мутациями, обуславливающими устойчивость к препаратам выбора при лечении сальмонеллезов (Accession number: KT955017, MG596303, MK112505 - MK112509).

Автором впервые на территории Российской Федерации выявлены штаммы сальмонелл, принадлежащие к международным клонам высокого риска с множественной резистентностью к антибиотикам.

Следует отметить, что работа проведена с использованием международных стандартизированных методов и критериев оценки результатов, что позволяет провести адекватное сравнение полученных автором данных с официальными данными ведущих международных систем надзора за антибиотикорезистентностью возбудителей инфекционных заболеваний: Европейского агентства по пищевой безопасности (EFSA) и Европейского центра по контролю заболеваемости (ECDC), национальной системы мониторинга за антибиотикорезистентностью США (NARMS), Интегративной программы надзора за антибиотикорезистентностью сальмонелл Канады (CIPARS).

Научные положения, выносимые автором на защиту, четко сформулированы, вытекают из содержания работы и отражают суть проведенной работы, полностью обоснованы наиболее значимыми результатами, полученными в ходе исследования. Сформулированная цель исследования достигнута решением поставленных задач, что аргументировано в выводах диссертации. Практические рекомендации логически следуют из полученных автором результатов и выводов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что автор дополнила имеющиеся сведения о биологических свойствах сальмонелл, оценив с одной стороны активность антибиотиков различных классов в отношении этого возбудителя, а с другой стороны – ответную реакцию микроорганизма посредством приобретения хромосомных и плазмидных механизмов резистентности, что способствует более полному пониманию взаимоотношений «возбудитель/антимикробный препарат».

Автором проведена оценка хромосомных и плазмидных механизмов резистентности и их фенотипического проявления: установлено нарастание уровня резистентности к хинолонам при накоплении числа хромосомных мутаций или приобретения одновременно нескольких механизмов.

Автором доказана необходимость включения в мониторинг сальмонеллезных инфекций молекулярно-генетических методов, позволяющих выявлять детерминанты резистентности и устанавливать принадлежность штаммов возбудителя к международным клонам высокого риска, что позволяет значительно расширить знания о глобально циркуляции полирезистентных генетических линий сальмонелл.

Используя методы биоинформатического анализа, автор доказал, что эволюция «российской» субпопуляции *Salmonella* Typhі следует глобальным тенденциям развития возбудителя брюшного тифа как в отношении формирования устойчивости к антибиотикам, так и в отношении эволюции филогенетической структуры: установлено, что большинство заболеваний на территории нашей страны вызваны штаммами международного клона высокого риска *Salmonella* Typhі субклады 4.3.1 с устойчивостью к фторхинолонам.

Полученные автором данные о том, что большая часть штаммов сальмонелл, выделенных в Российской Федерации в последние годы, устойчивы к фторхинолонам, препаратам выбора, имеют большую практическую значимость, так как позволяют прогнозировать их неэффективность, в эмпирической терапии сальмонеллезных инфекций, прежде всего брюшного тифа, в нашей стране.

Предложенные автором научно обоснованные алгоритмы детекции устойчивости к цефалоспорином и хинолонам повышают эффективность и достоверность рутинного определения чувствительности сальмонелл в бактериологических лабораториях, что позволяет повысить эффективность антимикробной терапии и снизить риски формирования и распространения резистентных штаммов. Эти методические 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».

**Достоверность и апробация результатов исследования,
в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность результатов исследования обеспечена достаточным размерами выборки и большим объемом исследования, адекватностью выбранных современных культуральных и молекулярно-генетических методов, использованием современного сертифицированного оборудования и материалов. Анализ данных молекулярно-генетических исследований проводился с использованием адекватного программного обеспечения и международных биоинформатических веб-платформ, с привлечением при необходимости соответствующих специалистов. Методы статистического анализа соответствовали дизайну исследования. Полученные автором данные согласуются с современными научными представлениями по исследуемой теме. Результаты диссертационного исследования представлены в виде докладов на 11 конгрессах и конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. Основное содержание работы отражено в 45 печатных работах, в том числе в 14 статьях в рецензируемых изданиях. Автором получены два патента на штаммы и созданы три базы данных, содержащие результаты исследования. Материалы диссертации учтены при разработке трех методических и клинических рекомендаций, учебно-

методического пособия, используются в рутинной работе практических бактериологических лабораторий инфекционных стационаров.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Егоровой Светланы Александровны написана по традиционному плану, включает введение, обзор литературы, семь глав собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы и приложения. Работа изложена на 292 страницах, содержит 33 таблицы и 54 рисунка, включая приложения. Список литературы включает 348 источников, из которых 71 отечественный и 277 иностранных. Более половины источников опубликованы в последние 5 лет.

В разделе «Введение» автор обосновал актуальность исследования и степень разработанности темы, поставил цель и задачи исследования, представил научную новизну, обосновал теоретическую и практическую значимость работы, представил положения, выносимые на защиту, указал личный вклад в выполнение исследования, подтвердил достоверность результатов. Раздел включает подробное описание использованных в работе бактериологических, молекулярно-генетических, биоинформатических и статистических методов. В сводной таблице представлен объем исследований, выполненных на различных этапах работы.

В «Обзоре литературы» представлены результаты анализа научных публикаций в области изучения сальмонеллезных инфекций, устойчивости к антибиотикам и молекулярных механизмов резистентности. Обзор легко читается, особый интерес представляет проведенное автором сравнение российских данных по частоте выделения устойчивых штаммов сальмонелл с данными ведущих мировых центров надзора за антибиотикорезистентностью микроорганизмов. Следует отметить, что обзор включает сводные таблицы и рисунки, что значительно облегчает восприятие материала.

Во второй главе подробно охарактеризованы штаммы сальмонелл «нетифоидных» сероваров, выделенные в Санкт-Петербурге в период с 2014 по

2019 год, проведена оценка чувствительности штаммов различных сероваров к 12 классам антибиотиков. Следует особо отметить, что автор изучила количественные уровни чувствительности сальмонелл к клинически значимым препаратам, выявила ведущие фенотипы множественной устойчивости, характерные для различных сероваров, а также оценила динамику показателей устойчивости по сравнению с 2002-2005 годами.

Третья глава включает характеристику популяции возбудителя брюшного тифа, выделенного в Российской Федерации с 2005 по 2019 годы по уровням чувствительности к клинически значимым антибиотикам. Также представлена структура изученной коллекции штаммов *S. Typhi* по фенотипам резистентности. Следует отметить, что автор оценила чувствительность возбудителя практически ко всем антибиотикам, использовавшимся ранее и используемым сегодня для лечения брюшного тифа.

В четвертой главе описаны методы и результаты оценки устойчивости сальмонелл к бета-лактамам: приведены результаты фенотипической детекции устойчивости к цефалоспорином расширенного спектра с использованием оптимизированного автором алгоритма для дифференциации «классических» бета-лактамаз расширенного спектра и AmpC-цефалоспориноз, включающего определение чувствительности к индикаторным цефалоспорином (цефтазидиму, цефотаксиму, цефокситину, цефепиму) и тесты с ингибиторами бета-лактамаз. Представлены результаты молекулярно-генетических исследований: описаны выявленные гены бета-лактамаз и оценено соответствие фенотипа молекулярному механизму резистентности. В главе охарактеризован полирезистентный штамм *Salmonella* Newport MDR-AmpC, относящийся к международному клону высокого риска. Оценена чувствительность штаммов сальмонелл, устойчивых к цефалоспорином расширенного спектра, к другим альтернативным антибиотикам.

В пятой главе автором проведено сравнение методических подходов к выявлению резистентности к хинолонам у сальмонелл, особенно устойчивости низкого уровня, выявление которой наиболее проблематично в бактериологических лабораториях, использующих диско-диффузионный

метод и один индикаторный препарат пefлоксацин. В данной главе автор научно обосновал предложенный им алгоритм выявления устойчивости к этой группе препаратов, включающий скрининг диско-диффузионным методом с двумя индикаторными препаратами – пefлоксацином и налидиксовой кислотой, и определение МПК ципрофлоксацина. Данный раздел имеет большое практическое значение для совершенствования лабораторной диагностики устойчивости к хинолонам в рутинной практике.

Шестая глава включает результаты изучения механизмов резистентности сальмонелл к хинолонам, полученные молекулярно-генетическими методами – секвенирование по Сенгеру и полногеномное секвенирование. Описаны варианты сочетания однонуклеотидных замен в хромосомных генах *gyrA* и *parC*, выявленные автором, оценено их соответствие различным уровням устойчивости штаммов сальмонелл, дана детальная характеристика штамма *Salmonella* Kentucky ST198, принадлежащего к международному клону высокого риска с высокоуровневой устойчивостью к фторхинолонам.

В седьмой главе охарактеризованы молекулярные механизмы множественной устойчивости, выявленные автором у штаммов возбудителя брюшного тифа: описаны варианты и сочетания хромосомных мутаций и плазмидных генов. В этом разделе автор обосновал перечень индикаторных антибиотиков, необходимый для осуществления адекватного и достоверного мониторинга чувствительности сальмонелл, включающий не только антибиотики выбора и альтернативные, использующиеся для лечения сальмонеллезных инфекций (аминопенициллины, цефалоспорины, фторхинолоны, азитромицин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол, нитрофураны), но также критически важные для медицины (карбапенемы), позволяющие выявить важный механизм резистентности (налидиксовая кислота, пefлоксацин, цефокситин), перспективные для лечения инфекций, вызванных полирезистентными штаммами (колистин, тигециклин), антибиотики-маркеры эпидемических международных клонов возбудителя (аминогликозиды, тетрациклин).

В восьмой главе приведены результаты молекулярно-генетического типирования штаммов возбудителя брюшного тифа методами пульс-гель-электрофореза, мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) и SNP-типирования. Результаты молекулярно-генетического типирования, полученные различными методами, представлены в виде сводной таблицы, что дает возможность сравнительной оценки их эпидемиологической информативности. В главе представлено филогенетическое дерево, построенное автором по результатам SNP-типирования, где российские штаммы представлены в структуре мировой популяции возбудителя.

В главе «Обсуждение результатов» автор обобщила полученные результаты и проанализировала ситуацию, сложившуюся в Российской Федерации, в сравнении с имеющимися научными отечественными и зарубежными данными.

Диссертацию завершают восемь выводов, основанных на полученных результатах, которые соответствуют поставленным цели и задачам и отражают содержание всех этапов диссертационной работы.

В разделе **«Практические рекомендации»** дано семь предложений относительно совершенствования различных этапов мониторинга устойчивости к антибиотикам у штаммов сальмонелл, касающиеся выбора индикаторных препаратов, алгоритмов тестирования и оценки результатов.

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

Соответствие специальности

По направленности исследования и использованным в работе методам, представленным положениям и выводам диссертационная работа Егоровой Светланы Александровны 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».

В тексте диссертации имеются стилистические и грамматические ошибки. Имеющиеся замечания не носят принципиального характера, не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

В ходе подробного изучения работы возникли **вопросы**:

1. По результатам исследования выявил ли автор отличия в механизмах резистентности к бета-лактамам, характерные для штаммов сальмонелл, отличающие их от штаммов других энтеробактерий?
2. Выявлены ли в ходе диссертационного исследования значительные отличия в механизмах резистентности среди популяции российских и зарубежных штаммов сальмонелл?
3. Насколько значимы для клинической практики высокие показатели резистентности сальмонелл к нитрофуранам и колистину, выявленные автором? Какими молекулярными механизмами обусловлена устойчивость к этим препаратам?

Заключение

Диссертационная работа Светланы Александровны Егоровой на тему «Мониторинг чувствительности бактерий рода *Salmonella* к антибиотикам с учетом молекулярных механизмов резистентности» является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований решена проблема совершенствования микробиологического мониторинга сальмонеллезом, связанная с риском возникновения и распространения устойчивых к антибиотикам штаммов, имеющая важное значение для медицинской микробиологии.

Диссертационная работа Светланы Александровны Егоровой «Мониторинг чувствительности бактерий рода *Salmonella* к антибиотикам с учетом молекулярных механизмов резистентности», 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

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; 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4; тел.: +7 (495) 438-25-10; e-mail: priput1@gmail.com

доктор медицинских наук

Припутневич Татьяна Валерьевна

Подпись доктора медицинских наук

Припутневич Татьяны Валерьевны заверяю

Ученый секретарь федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

кандидат медицинских наук, доцент

Павлович Станислав Владиславович

11.01.2021 г.