

Отзыв

официального оппонента, члена-корреспондента Российской академии наук, доктора медицинских наук, профессора Суворова Александра Николаевича 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

В Российской Федерации сальмонеллезные инфекции лидируют в структуре острых кишечных инфекций бактериальной этиологии. Актуальность сальмонеллезов обусловлена возможностью генерализации инфекции, формирования бактерионосительства, возникновения групповых случаев заболевания. Сальмонеллезы поражают ежегодно 21 миллион человек, приводя к 200 000 смертям в мире. Экономические потери от сальмонеллезных заболеваний огромны и только в США составляют ежегодно 4-5 миллиардов долларов США.

Неуклонный рост устойчивости к антибиотикам у штаммов сальмонелл требует постоянного мониторинга активности современных антибиотиков, используемых или перспективных для лечения сальмонеллезов. Недостаточно широкое применение методов молекулярной диагностики штаммов сальмонелл с лекарственной устойчивостью затрудняет выявление устойчивости возбудителя рутинными лабораторными методами и диктует необходимость использования надежных методов их микробиологической и молекулярно-генетической диагностики. Корректное сравнение данных российских и зарубежных исследователей о масштабах распространения антибиотикорезистентности в популяции сальмонелл возможно только при использовании единых стандартизованных методических и интерпретационных подходов. Современные методы молекулярно-генетического анализа позволяют следить за циркуляцией определенных генетических линий сальмонелл, представляющих угрозу вследствие ассоциации с множественной резистентностью к антибиотиками.

Глобализация торговых связей и расширение туризма способствует межконтинентальному распространению штаммов международных клонов высокого риска и их завозу в Российскую Федерацию.

Учитывая вышесказанное, диссертационная работа Егоровой Светланы Александровны, использующая молекулярно-генетические подходы в мониторинге чувствительности и устойчивости к антибиотикам в популяции сальмонелл, выделенных в Российской Федерации, является безусловно актуальной и своевременной.

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

Новизна работы заключается в получении новых современных данных о чувствительности сальмонелл практически ко всем классам антибиотиков. Автор представил результаты тестирования не только препаратов, используемых для лечения сальмонеллезов, но и необходимых в рамках проведения мониторинга сальмонеллезных инфекций для детекции значимых механизмов резистентности, перспективных в отношении полирезистентных штаммов, а также препаратов, которые могут служить «эпидемиологическим» маркером штамма.

Представлена всеобъемлющая характеристика современной «российской» популяции возбудителя брюшного тифа: дана оценка активности различных антибиотиков, представлены механизмы устойчивости, установлены филогенетические взаимоотношения «российских» штаммов *Salmonella Typhi* с глобальной популяцией возбудителя.

Изучение молекулярных механизмов устойчивости позволило автору впервые выявить на территории Российской Федерации полирезистентные штаммы сальмонелл международных клонов высокого риска: *Salmonella Newport* MDR/AmpC, *Salmonella Kentucky* ST198, *Salmonella Typhi* субклады 4.3.1.

В результате проведенного исследования получены новые данные о молекулярных механизмах резистентности сальмонелл в Российской Федерации: выявлена продукция бета-лактамаз генетических семейств TEM,

СТХ-М и СМУ-2, различные варианты однонуклеотидных замен в хромосомных генах *gyrA* и *parC*, редкий плазмидный механизм устойчивости, обусловленный геном *qnrS*. Новизна исследования подтверждена двумя патентами на изобретение РФ.

Сформулированные автором научные положения, выводы и практические рекомендации научно обоснованы и вытекают из результатов проведенных исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что автор в результате изучения большой коллекции штаммов современными методами расширил представления о биологических свойствах сальмонелл: уровнях природной чувствительности и распределении изученной популяции по значениям минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков различных классов, молекулярных механизмах резистентности и филогенетической характеристике. Представленные в работе данные отражают особенности «российской» субпопуляции сальмонелл в сравнении с глобальной популяцией возбудителя.

В работе значительно расширено представление о фенотипических проявлениях различных молекулярных механизмов резистентности, показано влияние вариантов и количества хромосомных мутаций в генах *gyrA* и *parC* на уровень устойчивости сальмонелл к хинолонам.

Результаты работы свидетельствуют, что мониторинг чувствительности сальмонелл, базирующийся на комплексе фенотипических и молекулярных методов, может быть эффективным инструментом эпидемиологического надзора за сальмонеллезами в отношении выявления завоза на территорию Российской Федерации штаммов международных клонов высокого риска, представляющих угрозу вследствие множественной резистентности к антибиотикам и возможности эпидемического распространения.

Практическая значимость работы обусловлена тем, что автором показана необходимость детекции клинически значимых молекулярных

механизмов резистентности, в том числе экспрессируемых на низком уровне, и научно обоснованы методические подходы для такой детекции в рутинной лабораторной практике. Предложенные автором подходы – индикаторные препараты для тестирования, фенотипические алгоритмы детекции, молекулярно-генетические методы детекции механизмов резистентности и типирования возбудителей – являются основой мониторинга чувствительности сальмонелл к антибиотикам. Применение этих подходов в рутинной практике позволит повысить достоверность лабораторной диагностики и эффективность антимикробной терапии.

Полученные автором данные об активности различных антибиотиков в отношении штаммов сальмонелл, циркулирующих в Санкт-Петербурге, позволяют актуализировать схемы эмпирической терапии сальмонеллезных инфекций на основе выбора наиболее активных препаратов.

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

Достоверность полученных автором результатов обеспечена адекватностью и широким спектром методов, использованных на различных этапах исследования, включая бактериологические и молекулярно-генетические. Результаты получены при изучении более 1000 штаммов сальмонелл, включая возбудителя брюшного тифа, выделенных в течении последних лет на различных территориях Российской Федерации. Биоинформатический анализ проведен с использованием международных алгоритмов, веб-платформ и баз данных, что обеспечило его достоверность. Статистическая обработка количественных показателей проведена с использованием адекватных методов, что подтверждает достоверность полученных результатов.

Апробированные в диссертационном исследовании алгоритмы исследований внедрены в работу бактериологических лабораторий трех стационаров Санкт-Петербурга и используются при бактериологическом обследовании пациентов инфекционных отделений. Материалы диссертации

включены в программы повышения квалификации врачей по специальности «Бактериология» ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова».

Результаты исследований представлены на конференциях международного и всероссийского уровней, в 45 публикациях, в том числе в 14 статьях в рецензируемых научных изданиях. Автором получено два патента на изобретение, зарегистрированы три базы данных. Материалы диссертации учтены при разработке трех методических и клинических рекомендаций, учебно-методического пособия для врачей-бактериологов, вошли в два аналитических обзора.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация Егоровой С.А. изложена по традиционному плану, занимает 292 страницы машинописного текста, содержит 33 таблицы и 54 рисунка, включая приложения. Работа включает введение, обзор литературы, собственные исследования в семи главах, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы и восемь приложений.

Во введении представлены актуальность исследования, степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту. Автор описал различные методы исследования и программное обеспечение, использованные в работе, показал объем выполненных исследований и личный вклад в выполнение исследования, обосновал достоверность результатов.

Обзор литературы изложен на 52 листах, основан на анализе 348 источников, включая 277 зарубежных. Об актуальности представленной информации свидетельствует то, что более половины источников опубликованы в последние пять лет. В обзоре представлен сравнительный анализ серологической структуры сальмонеллезных инфекций и устойчивости к антибиотикам штаммов сальмонелл в европейских странах, США, Канаде и

Российской Федерации с использованием официальных данных национальных и международных систем надзора за инфекционными заболеваниями и антибиотикорезистентностью микроорганизмов. Также автор описал наиболее значимые для клинической практики механизмы резистентности к антибиотикам, выявленные у сальмонелл, и молекулярно-генетические методы, используемые в настоящее время для детекции антибиотикорезистентности и генотипирования возбудителей сальмонеллезов. В обзоре описаны современные особенности глобальной популяции возбудителя брюшного тифа, включая чувствительность к антибиотикам и филогенетическую структуру. Обзор содержит шесть обобщенных таблиц и два рисунка, которые значительно облегчают восприятие материала. Из обзора литературы логично вытекает актуальность и необходимость диссертационного исследования, проведенного автором.

Во второй главе дано описание сероваровой структуры и чувствительности к различным классам антибиотиков штаммов сальмонелл «не-тифоидных» сероваров, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2019 гг. Результаты представлены как для всей изученной популяции, так и для отдельных сероваров. Обращает на себя внимание, что для характеристики чувствительности сальмонелл автор использовал количественные методы, позволяющие оценить распределение изученных штаммов по значениям МПК антибиотиков, что представлено на многочисленных гистограммах.

Третья глава включает результаты оценки чувствительности к антибиотикам штаммов *S.Typhi*, возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного в Российской Федерации в последние 15 лет. Следует отметить, что автором изучена активность в отношении возбудителя брюшного тифа широкого спектра антибиотиков, когда либо использовавшихся для лечения брюшного тифа, как современных (фторхинолоны, цефалоспорины, азитромицин, карбапенемы), так и «старых» (ампициллин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол). Распределение изученных штаммов по значениям МПК антибиотиков представлены на гистограммах.

Четвертая глава посвящена выявлению устойчивости штаммов сальмонелл к бета-лактамным антибиотикам, которые широко используются для лечения сальмонеллезных инфекций. Автор привел результаты фенотипического скрининга, дал оценку диагностической ценности предложенного алгоритма при дифференциации различных бета-лактамаз. Также приведены результаты молекулярно-генетических исследований: описаны гены, кодирующие бета-лактамазы различных генетических семейств, выявленные в ходе работы у штаммов сальмонелл. В разделе дана характеристика полирезистентного штамма *Salmonella* Newport, которая свидетельствовала о принадлежности его к международному клону высокого риска.

В пятой главе автор провел сравнительную оценку различных методических подходов к выявлению устойчивости сальмонелл к хинолонам, научно обосновал алгоритм детекции такой устойчивости с использованием индикаторных препаратов, показал его эффективность при выявлении устойчивости низкого уровня к фторхинолонам у штаммов сальмонелл.

В шестой главе автор описал хромосомные и плазмидные механизмы устойчивости к хинолонам, выявленные в ходе диссертационного исследования у штаммов сальмонелл, и показал их влияние на формирование фенотипа и уровня резистентности к индикаторным препаратам. Также в разделе дана характеристика высокоустойчивому к фторхинолонам штамму *Salmonella* Kentucky, которая свидетельствовала о принадлежности его к международному клону высокого риска ST198.

Седьмая глава посвящена молекулярным механизмам устойчивости полирезистентных штаммов возбудителя брюшного тифа: охарактеризованы различные варианты хромосомных мутаций в генах *gyrA* и *parC*, обуславливающие устойчивость к хинолонам, и гены устойчивости к «старым» препаратам, расположенные на плазмидах. В разделе автором предложен перечень препаратов для проведения мониторинга чувствительности сальмонелл к антибиотикам.

В восьмой главе дана филогенетическая характеристика популяции возбудителя брюшного тифа с использованием методов пульс-гель-

электрофореза, мультилокусного сиквенс-типирования и SNP-типирования, представленная в виде филогенетического дерева. Автор выполнил биоинформатический анализ по результатам оценки полиморфизма единичных нуклеотидов в геноме штаммов возбудителя, сравнил результаты с имеющимися зарубежными данными. Особенно следует отметить информативные таблицы, позволяющие оценить соответствие результатов, полученных различными методами.

В обсуждении автор сопоставила полученные результаты с научными данными отечественных и иностранных исследователей. Работа завершается восьмью выводами, соответствующими цели и задачам диссертационного исследования, и практическими рекомендациями, направленными на повышение достоверности процедуры определения чувствительности сальмонелл к антибиотикам и совершенствование мониторинга сальмонеллезов.

Соответствие специальности

Диссертационная работа Егоровой Светланы Александровны по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам 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. С чем автор связывает более низкую степень лекарственной устойчивости к фторхинолонам у штаммов сальмонелл, содержащих гены устойчивости на плазмидах?

2. В работе автор предлагает актуализировать схемы эмпирической терапии сальмонеллезных инфекций. Не следует ли вместо этого включать в

схемы терапии средства молекулярной идентификации генов лекарственной устойчивости?

3. Какие из методов молекулярно-генетической детекции механизмов резистентности и типирования возбудителей, использованных автором в работе целесообразно использовать для рутинной детекции эпидемических клонов сальмонелл?

4. Учитывая отсутствие выявленных в результате исследования штаммов сальмонелл, устойчивых к карбапенемам, как автор относится к перспективам использования данной группы антибиотиков в терапии сальмонеллезов?

5. При проведении молекулярно-генетического типирования штаммов возбудителя брюшного тифа автор использует понятие «гаплотип». Учитывая тот факт, что геном бактерий, включая сальмонеллы, является гаплоидным, в чем состоит отличие этого понятия от понятия «генотип»?

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 «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

Заведующий отделом молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»; 197376, город Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, дом 12; телефон:+7(812)234-68-68; e-mail: alexander_suvorov1@hotmail.com

член-корреспондент Российской академии наук,
доктор медицинских наук,
профессор



Суворов Александр Николаевич

Подпись члена-корреспондента Российской академии наук,
доктора медицинских наук, профессора
Суворова Александра Николаевича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»,

Доктор биологических наук



Пшенкина Надежда Николаевна.

11.01.2021 г.

