

## Отзыв

официального оппонента, доктора медицинских наук Мавзютова Айрат Радиковича на диссертационную работу Макаровой Марии Александровны на тему «Гетерогенность популяции патогенных *Escherichia coli* – возбудителей кишечных инфекций и заболеваний внекишечной локализации» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### Актуальность темы исследования

Актуальность избранной диссертантом темы не вызывает сомнений. Широкий спектр заболеваний, обусловленных *E. coli*, возникновение крупных пищевых вспышек, гнойно-септических инфекций, в том числе, связанных с оказанием медицинской помощи, а также генерализация инфекции с развитием тяжелых осложненных форм или длительной персистенции возбудителя в организме человека, свидетельствуют о высокой эпидемиологической, клинической и социально-экономической значимости эшерихиозов и постоянной необходимости анализа их генетических вариантов, спектра вирулентности и механизмов резистентности уже циркулирующих и впервые появляющихся патогенных *E. coli* на современном уровне знаний. Актуальным направлением исследования является изучение патогенного потенциала *E. coli*, входящих в состав микробиома кишечника человека. Отдельную, важную проблему представляют *E. coli* с множественной устойчивостью резистентные к цефалоспорином и карбапенемам, которые по потребности в создании новых antimicrobных препаратов отнесены к группе микроорганизмов с критически высоким уровнем приоритетности. Быстрый рост резистентности к цефалоспорином и карбапенемам в популяции *E. coli* связан с распространением международных успешных клонов, относящихся к «клонам высокого риска», и в первую очередь сиквенс типа 131 (ST131), для которого характерна выраженная резистентность к antimicrobным препаратам и способность быстро приобретать дополнительные детерминанты резистентности.

Таким образом, работа, выполненная Макаровой М.А., является масштабным исследованием, направленным на исследование популяции патогенных *E. coli*, вызывающих острые кишечные инфекции и заболевания внекишечной локализации, и комменсальных *E. coli* – представителей кишечной микробиоты человека, для повышения эффективности лабораторной диагностики вызываемых ими инфекционных заболеваний и высокоинформативной оценки патогенного потенциала штаммов *E. coli* на основе сочетания традиционных и молекулярных микробиологических

технологий, изучения механизмов клинически значимой резистентности на молекулярном уровне. В связи с чем представляется крайне актуальной и своевременной.

### **Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна диссертационной работы Макаровой Марии Александровны несомненна. В результате многолетних исследований на большом количестве штаммов диссертантом впервые в России охарактеризованы биологические свойства и патогенный потенциал клинических штаммов *E. coli* – возбудителей диарейных и гнойно-септических заболеваний и представителей нормобиоты кишечника человека.

Выявленные комплексы генов вирулентности и кластеры O- и H-антигенов диареогенных штаммов *E. coli* существенно расширили сведения об эпидемиологических особенностях циркулирующих в РФ возбудителях острых кишечных инфекций. Так, впервые выявлены и описаны штаммы энтероаггративных *E. coli* (EAgEC), ранее не диагностируемой патогруппы в РФ, и получены результаты, имеющие мировое значение, о сочетанном, генетически обусловленном потенциале вирулентности EAgEC – носителях кластеров генов, ассоциируемых с возбудителями диарейных заболеваний и инфекций внекишечной локализации.

В работе впервые проведена комплексная характеристика штаммов *E. coli* - возбудителей заболеваний внекишечной локализации, свидетельствующая о генетической вариабельности патогенного потенциала. Показано, что наличие генов вирулентности (*afa*, *pap*, *sfa*, *kps*, *ibeA*) является прогностическим признаком риска развития хронического течения болезни и острых жизнеугрожающих состояний, таких как сепсис (уросепсис) и менингит.

Несомненной заслугой диссертанта являются исследования по изучению чувствительности к исключительно широкому спектру антибиотиков. Показана высокая частота встречаемости штаммов (49,8%) с множественной устойчивостью к клинически значимым антимикробным препаратам в популяции *E. coli*. Следует отметить, что диссертант существенно дополнила имеющуюся характеристику популяции патогенных *E. coli* - возбудителей заболеваний внекишечной локализации, включая ИСМП, данными о резистентности штаммов *E. coli* - возбудителей острых кишечных инфекций, а также представителей нормобиоты кишечника. Сравнительный анализ генетических детерминант резистентности показал, что устойчивость к цефалоспорином III–IV поколений в субпопуляциях *E. coli* обусловлена ведущим в мире механизмом – продукцией бета-лактамаз генетических семейств СТХ-М.

Всесторонняя характеристика *E. coli* позволила установить, что на территории РФ циркулируют штаммы, принадлежащие к международным клонам высокого риска – STEC O26:H11-B1-ST21 – возбудитель диарейных заболеваний и ExPEC O25:H4-B2-ST131 – возбудитель заболеваний внекишечной локализации.

Диссертантом впервые установлен факт колонизации кишечника штаммами *E. coli*, принадлежащими к международным клонам высокого риска с множественной резистентностью к антибиотикам, что подтверждает настоятельную необходимость участия России в международных программах по противостоянию росту и распространению резистентности к антибиотикам.

В целом, используемые материалы, примененные методы и объем проведенных исследований обеспечивают выполнение поставленных перед диссертантом задач и научное обоснование выводов и рекомендаций.

Основные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные диссертантом, являются научно-обоснованными и основаны на результатах проведенных исследований.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Макаровой М.А. обусловлена значительным объемом проведенных исследовательских работ, основанных на современных методологических подходах, базирующихся на анализе современной научной литературы; использованием широкого спектра современных микробиологических и молекулярных методов исследования, стандартизованных алгоритмов и международных веб-платформ; объемом и репрезентативностью исследований (более 1700 штаммов *E. coli*). Фактический материал проанализирован с использованием адекватных методов статистической обработки количественных показателей, что подтверждает значимость и достоверность полученных результатов.

Автором в полной мере решены поставленные задачи, соответствующие цели, что нашло отражение в обосновании и выводах исследования. Полученные результаты согласуются с современной научной литературой в данной области, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов. Изложенные диссертантом научные положения, сформулированные выводы и практические рекомендации, логичны и вытекают из результатов исследований.

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

Диссертантом в результате проведенного исследования теоретически обосновано и практически подтверждено значение и целесообразность использования комплекса культуральных и молекулярных методов при

лабораторной диагностике заболеваний, обусловленных *E. coli*, которые позволяют охарактеризовать популяцию патогенных штаммов *E. coli* по антигенным, вирулентным свойствам, выявлять эпидемически и клинически значимые клональные комплексы, проводить надзор за появлением на территории РФ возбудителей с новыми или измененными свойствами, уменьшать систематические ошибки на постаналитическом этапе лабораторной диагностики.

Научно обоснованы дополнительные критерии оценки патогенного потенциала штаммов *E. coli*, вызывающих острые кишечные инфекции, заболевания внекишечной локализации и колонизирующих кишечник человека, завоза и циркуляции на территории РФ международных клонов высокого риска.

Научные положения и полученные результаты имеют большую практическую значимость для совершенствования лабораторной диагностики заболеваний эшерихиозной этиологии; молекулярно-генетического мониторинга возбудителей и облигатных представителей нормобиоты кишечника; оптимизации методов детекции клональной принадлежности; профилактики жизнеугрожающих осложнений в рутинной практике. Результаты изучения резистентности популяции *E. coli* имеют важное практическое значение, поскольку позволяют актуализировать рекомендации по антимикробной терапии, разрабатывать универсальные методы выявления клональной принадлежности штаммов.

Результаты диссертационной работы реализованы при разработке Федеральных клинических рекомендаций «Принципы организации мониторинга устойчивости ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к антимикробным препаратам в лечебно-профилактических медицинских организациях здравоохранения» и «Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»; Клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам»; Методических указаний «Особенности лабораторной диагностики эшерихиозов, обусловленных энтерогеморрагическими *E. coli* O157:H7»; Практических рекомендаций «Преаналитический этап микробиологических исследований»; использованы в образовательном процессе кафедр микробиологии, лекционном материале сертификационных курсов усовершенствования и дополнительных профессиональных программ повышения квалификации врачей по специальности «Бактериология» в «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» и «Смоленский государственный медицинский университет»; внедрены в работу

бактериологических лабораторий 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 диссертантом базы данных, содержащие характеристику о биологических свойствах, выделенных на территории Российской Федерации, штаммов *E. coli* могут быть основой молекулярно-генетического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, вызванными патогенными *E. coli*.

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

Результаты исследований доложены и обсуждены на 27 конгрессах и конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. Основное содержание работы достаточно полно отражено в 60 печатных работах, в том числе в 26 статьях в рецензируемых изданиях. Получен патент на изобретение и семь свидетельств о регистрации баз данных. Материалы диссертации вошли в отдельные главы Национального руководства, двух справочников, разделы четырех монографий, учтены при разработке двух учебно-методических пособий.

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

Диссертационная работа Макаровой М.А. изложена традиционно на 251 страницах машинописного текста, содержит введение (включающее методологию и методы исследования), обзор литературы, пять глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы и 12 приложений. Работа иллюстрирована 45 таблицами и 15 рисунками. Список литературы содержит 372 источника, в том числе – 102 отечественных и 250 иностранных. Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объеме представлены в автореферате и полностью соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата полностью отвечает существующим требованиям.

В разделе «**Введение**» диссертантом обоснована актуальность исследования и показана 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.

Первая глава «**Обзор литературы**» состоит из десяти разделов, включает анализ научных публикаций в ведущих отечественных и зарубежных журналах, представленных авторитетными специалистами в вопросах, посвященных теме исследования. Автор представила современные данные о бактериях рода *E. coli*, касающиеся антигенной структуры, филогенетических группах, факторах патогенности и, кодирующих их генах, подробно описала патотипы и патогруппы *E. coli* – возбудителей инфекционных заболеваний, механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам. В заключительном разделе обзора автор анализирует методы, используемые при лабораторной диагностике заболеваний, обусловленных *E. coli*, объясняя их достоинства и недостатки.

Раздел «**Результаты собственных исследований**» состоит из пяти больших самостоятельных глав, включающих весь объем проведенных исследований.

**Вторая глава** посвящена характеристике биологических свойств штаммов *E. coli* – возбудителей острых кишечных инфекций. Полученные диссертантом данные показывают, что в РФ диарейные заболевания у детей и взрослых обусловлены штаммами диареогенных *E. coli*, которые принадлежат к разным филогенетическим группам, характеризуются широким разнообразием антигенных вариантов, наличием генов, кодирующих основные и дополнительные факторы вирулентности, имеющие клиническое и эпидемиологическое значение. Автором представлена полная характеристика биологических свойств, циркулирующих на территории РФ энтеропатогенных, энтеротоксигенных, энтероинвазивных, шигатоксин-продуцирующих и энтероаггегативных *E. coli*. Отдельно автором показано, что традиционный культуральный метод, основанный на морфологических, биохимических и серологических свойствах *E. coli*, характеризует внутривидовую фенотипическую неоднородность выделенного штамма, а этиологическую значимость при диарейных заболеваниях выделенного штамма *E. coli* можно определить только при применении комплекса культуральных и молекулярных методов. Использование молекулярных методов позволило выявить штаммы, принадлежащие к успешным международным клонам *E. coli* O26:H11 ST21, которые относят к

возбудителям заболеваний общих для человека и животных. Важным выводом являются данные о том, что 75% штаммов EAgEC являются носителями кластеров генов, ассоциированных с возбудителями острых кишечных инфекций и заболеваний внекишечной локализации.

В третьей главе представлены результаты изучения штаммов *E. coli*, выделенных из различных биологических материалов (кровь, моча, раневое отделяемое, мокрота, перитонеальная жидкость). Детальное изучение штаммов показало, что 50,8% принадлежали к филогенетической группе B2, ассоциируемой с возбудителями заболеваний внекишечной локализации. У 12% штаммов, выделенных из мочи, выявлены маркеры неблагоприятного прогноза течения ИМП: 10,7% - гены *sfa* и *kpsK1*, наличие которых характерно для сепсис (уросепсис) ассоциированных *E. coli* (SEPEC); 1,3% штаммов - ген *ibeA*, ассоциированного с менингеальными *E. coli* (NMEC). Выделенные из мочи 14,9% характеризовались гибридным энтероаггративным/уропатогенным генотипом. Методом MLST - типирования установлено, что 23,3% штаммов *E. coli* - возбудителей заболеваний внекишечной локализации принадлежат к международному клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131.

В четвертой главе диссертант приводит результаты изучения штаммов *E. coli*, выделенных из испражнений взрослых жителей Санкт-Петербурга без признаков острых и хронических заболеваний ЖКТ. Штаммы с типичными культурально-морфологическими свойствам, ферментативно-активного варианта *E. coli*, не содержащие гены вирулентности, ассоциированные с возбудителями диарейных заболеваний, были расценены как облигатные факультативно-анаэробные представители нормобиоты кишечника. Молекулярным методом автором было установлено, что 38,7% штаммов имели высокий потенциал развития заболеваний внекишечной локализации, в частности ИМП. Важным результатом этой главы являются данные о колонизации кишечника здорового человека штаммами, принадлежащими к международному клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131. Полученные диссертантом данные указывают на актуальность и важность изучения популяции синантропных *E. coli*, так как эти исследования представляют собой основу для совершенствования методов прогнозирования и ранней клинической диагностики и профилактики инфекционных заболеваний внекишечной локализации.

Пятая глава диссертации посвящена характеристике резистентности к антимикробным препаратам штаммов *E. coli*, выделенных от больных и здоровых лиц. Для тестирования штаммов диссертант использовал антимикробные препараты, рекомендованные для использования в качестве эмпирической терапии стартового, первого и второго выбора

распространенных инфекционных синдромов, вызванных *E. coli*, а также, включенные в перечень для мониторинга, которым следует уделять особое внимание в рамках стратегии рационального использования антибиотиков. Полученные автором результаты свидетельствуют о широком распространении резистентности среди штаммов *E. coli*, выделенных по различным клинико-эпидемиологическим показаниям (ОКИ, ГСИ, ИСМП) и от здоровых лиц к цефалоспорином III-IV поколений, за счет ведущего механизма – продукции бета-лактамаз расширенного спектра идентичных классов СТХ-М. В отношении всей популяции *E. coli* наибольшую активность показали меропенем (99,8%), амикацин (93,9%) и нитрофурантоин (95,3%). Полученные диссертантом результаты демонстрируют необходимость постоянного мониторингового контроля за резистентностью *E. coli*, вне зависимости от патологического процесса.

В шестой главе на примере *E. coli* трех серологических групп O6, O25 и O144 диссертантом описаны ошибки постаналитического этапа лабораторного исследования при обосновании этиологической значимости выделенных штаммов как возбудителей ОКИ. Следует отметить, что в практических микробиологических лабораториях по результатам видовой и серологической идентификации штаммы этих сероваров систематически регистрируют как возбудители ОКИ: *E. coli* O6 и O25 – как энтеротоксигенные, *E. coli* O144 – как энтероинвазивные. Проведенные диссертантом исследования показали, что штаммы трех серогрупп *E. coli* O6, O25 и O144 не имеют генов вирулентности возбудителей диарейных заболеваний. Штаммы O6 и O25 по набору генов вирулентности принадлежат к возбудителям заболеваний внекишечной локализации, в частности ИМП. Штаммы *E. coli* O144 по результатам полногеномного секвенирования относились к новому непатогенному серологическому варианту O144:H45 (патент RU 2707640 C1). Существенным результатом этой главы является установленный автором вывод, что случаи выделения из испражнения здоровых лиц штаммов *E. coli* O25, зарегистрированных как «носительство энтеротоксигенных *E. coli*», принадлежали к пандемическому клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131, характеризующимся экстремальной резистентностью к антибиотикам. Полученные автором в этой главе результаты показали, что важным условием эффективности культурального исследования проб испражнений является адекватный выбор дополнительных молекулярных методов детекции диареогенных *E. coli*, так как этиологическая значимость разных клинических форм заболеваний, обусловленных *E. coli*, определяется наличием генов вирулентности у конкретного штамма возбудителя.



В разделе «**Заключение**» автор продемонстрировала 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.

Завершают диссертацию **выводы**, которые соответствуют поставленным задачам, суммируют главные результаты исследования и свидетельствуют о достижении цели работы.

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

В разделе «**Практические рекомендации**» дано десять предложений, которые могут быть внедрены в лаборатории центров гигиены и эпидемиологии, практического здравоохранения, иного другого подчинения, что позволит осуществить более полное информационное обеспечение, качественную микробиологическую и эпидемиологическую диагностику заболеваний эшерихиозной этиологии.

Таким образом, диссертационная работа Макаровой Марии 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 Макаровой М.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.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

#### **Вопросы к автору:**

1. Какие из 17 исследованных в работе генов, ассоциируемых с вирулентностью штаммов *E. coli*, преимущественно выявляемых при патологии человека внекишечной локализации, следует рассматривать в качестве приоритетных и почему?

2. Чем обусловлена имеющая место стабильно высокая частота острых кишечных инфекций неустановленной этиологии?
3. Каковы ближайшие практические перспективы представленной в Вашей работе методологии молекулярно-эпидемиологического мониторинга в контроле инфекционно обусловленной патологии человека?
4. Как соотносятся информативность и показания к применению молекулярно-генетических и серологических методов типирования бактерий в системе эпидемиологического надзора, в том числе применительно к *E. coli*?
5. Существуют ли четкие фенотипические отличия патогенных вариантов *E. coli* от непатогенных? Если да, то какими генами они могут детерминироваться?
6. Какие из обнаруженных у *E. coli* генов и/или их фрагментов, ассоциируемых с патогенностью, можно использовать в качестве мишени при создании молекулярно-генетических тест-систем для оценки этиологической значимости клинических штаммов *E. coli*.
7. Какие направления оптимизации и совершенствования лабораторной диагностики эшерихиозов кишечной и внекишечной локализации следует признать перспективными? Возможна ли их гармоничная интеграция в существующие алгоритмы лабораторных исследований?

### Заключение

Диссертационная работа Макаровой Марии Александровны на тему «Гетерогенность популяции патогенных *Escherichia coli* – возбудителей кишечных инфекций и заболеваний внекишечной локализации» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором обширных исследований и разработок осуществлено решение важной научно-практической проблемы - совершенствования лабораторной диагностики заболеваний, обусловленных *E. coli* с учетом критериев оценки патогенного потенциала штаммов, вызывающих заболевания кишечной, внекишечной локализации и колонизирующих кишечник здоровых лиц, завоза и циркуляции на территории Российской Федерации штаммов, принадлежащих к международным клонам высокого эпидемического риска.

Диссертационная работа Макаровой Марии Александровны «Гетерогенность популяции патогенных *Escherichia coli* – возбудителей кишечных инфекций и заболеваний внекишечной локализации», 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 № 842 от 24.09.2013 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, № 426 от 20.03. 2021 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор Макарова Мария Александровна заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

#### Официальный оппонент

Заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Башкирский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

Адрес: 450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3;

тел.: 8 (347) 272-41-73

e-mail: ufalab@mail.ru

доктор медицинских наук, профессор



Мавзютов Айрат Радикович



14.09.2021