

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Рубальского Олега Васильевича на диссертационную работу Карцева Николая Николаевича «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика энтеротоксигенных и шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2011-2016 гг», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования. Актуальность *Escherichia coli* как патогена, способного вызывать у человека широкий спектр инфекционных патологий, весьма значительна. Диареегенные *E. coli* занимают значимое место среди бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций у детей в возрасте до 5 лет. Наибольшую опасность среди этих патогенов представляют энтеротоксигенные *E. coli*, вызывающие энтериты и энтероколиты, сопровождающиеся острой дегидратационной диареей, а также шига-токсин продуцирующие *E. coli*, являющиеся возбудителями геморрагического колита и гемолитико-уремического синдрома. Несомненный интерес представляет получение данных о распространенности разных генетических линий эшерихий на территории Российской Федерации, о фенотипических и генетических характеристиках современных клинических штаммов.

Диссертационная работа Карцева Н.Н. посвящена важной проблеме микробиологии – молекулярно-генетической характеристике клинических штаммов диареегенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в период с 2011-2016 годы. Поэтому цель работы – изучение микробиологических и молекулярно-генетических свойств энтеротоксигенных и шига-токсин продуцирующих штаммов *Escherichia coli*, возбудителей диареи и геморрагического колита, выделенных в 2011-2016 гг. в Российской Федерации – следует признать актуальной, оправданной как с теоретических, так и практических позиций. В своей работе диссертант

поставил задачи, решение которых при внедрении в практику позволит повысить качество диагностики и лечения эшерихиозных инфекций, тем самым улучшить санитарно-эпидемическое благополучие населения России. Методы, выбранные диссертантом для решения поставленных задач, следует считать вполне адекватными для выполнения диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Получены новые данные о биологических и генетических особенностях штаммов диареогенных эшерихий, продуцирующих шига- и энтеротоксины, выделенных на территории Российской Федерации от больных с острыми кишечными инфекциями и из продуктов питания, касающиеся их биохимических свойств, лекарственной чувствительности и генетических маркеров патогенности. Установлена этиологическая роль *E. coli* серогрупп O26 и O142 в возникновении ряда эпизодов энтеротоксигенной инфекции, что является вкладом в изучение этиологической структуры данного заболевания. Впервые от больного энтеротоксигенной инфекцией был выделен штамм *E. coli* серогруппы O26, несущий ген термолабильного энтеротоксина, что расширяет знания об этиологической структуре диарей, вызванных энтеротоксигенными *E. coli*. Определены сиквенс-типы энтеротоксигенных штаммов *E. coli*, среди которых 11 новых сиквенс-типов, не описанных ранее в мире и известный сиквенс-тип ST4. У штамма *E. coli* серотипа O101:H33, продуцирующего шига-токсин, определен новый, ранее не описанный сиквенс-тип ST145. Показано, что на территории Российской Федерации циркулируют антибиотикорезистентные энтеротоксигенные штаммы *E. coli*, несущие гены эпидемически значимых бета-лактамаз *bla*_{TEM} и *bla*_{CTX-M-15}, а также интегроны класса 1 с генетическими кассетами, определяющими устойчивость к аминогликозидам и сульфаниламидам. Выявлен новый этиологический агент геморрагического колита у детей –

гибридный штамм *E. coli* серотипа O101:H33, проявляющий свойства и несущий гены, характерные для энтерогеморрагических и энтеротоксигенных штаммов *E. coli* одновременно.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты свидетельствуют о продолжающейся в настоящее время эволюции патогенных штаммов *E. coli*, о чем свидетельствуют факты выявления у больных геморрагическим колитом и энтеротоксигенной диареей нового гибридного штамма *E. coli* O101:H33 и энтеротоксигенного штамма серогруппы O26, содержащего ген термолabileного энтеротоксина *elt*. Обнаружение новых вариантов этиологических агентов расширяет знания в области эпидемиологии энтеротоксигенной инфекции и инфекции, вызванной штаммами *E. coli*, продуцирующими шига-токсины. В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 27 штаммов *E. coli*, в том числе 21 – энтеротоксигенных, 4 – шига-токсин продуцирующих, 2 – энтеропатогенных, используемые в качестве контрольных штаммов при проведении молекулярно-генетических исследований. Создана и охарактеризована рабочая коллекция штаммов патогенных *E. coli* (n=405), в том числе: шига-токсин продуцирующие и энтерогеморрагические (n=68), энтеротоксигенные (n=23), энтеропатогенные (n=17) и энтероаггегативные (n=5), а также штаммы гибридной патогруппы: шига-токсин продуцирующие/энтеротоксигенные (n=3), которая может быть использована в научных и практических целях в качестве источника контрольных и референс-культур при оценке новых антимикробных препаратов, бактериофагов, бактериоцинов и других антимикробных субстанций; для валидации новых методов детекции патогенных эшерихий, а также сравнительной характеристики вновь выделяемых патогенных эшерихий, в том числе - атипичных.

Достоверность и апробация результатов исследования.

Достоверность полученных результатов определяется: объемом проведенных исследований, результаты которого явились основой для проведения научного анализа; адекватностью материала – объектов исследования – цели и задачам исследования; методами статистической обработки данных и использованием только достоверных результатов для научного анализа. Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 11 Всероссийских и международных конференциях. Апробация диссертации состоялась на заседании межлабораторного семинара ФБУН ГНЦ ПМБ 12 сентября 2017 года. Основное содержание работы отражено в 15 научных публикациях, в том числе 6 статей в рецензируемых изданиях, 2 тезисов в рецензируемых изданиях, 7 тезисов в материалах Всероссийских и международных конференций.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации.

Диссертация написана в традиционной форме и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список литературы, включающий 195 источников, из них 14 работ отечественных и 181 работу зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 16 рисунками и 20 таблицами, включает одно приложение.

Введение. Во введении диссертации представлены актуальность и степень разработанности темы исследования, отражены цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и сведения об апробации результатов, а также – личное участие автора в получении результатов и сведения о публикациях по

материалам диссертационной работы. Целью диссертационной работы явилось изучение микробиологических и молекулярно-генетических свойств энтеротоксигенных и шига-токсин продуцирующих штаммов *Escherichia coli*, возбудителей диареи и геморрагического колита, выделенных в 2011-2016 гг. в Российской Федерации. Задачи исследования соответствовали поставленной цели и обеспечивали ее выполнение. Цель и задачи диссертации сформулированы ее автором четко, ясно и лаконично.

Глава 1. Обзор литературы. В обзоре литературы в достаточном объеме представлены современные сведения о бактериях вида *Escherichia coli*. Отражены морфологические и культуральные свойства патогена, его клиническая значимость в мире и в нашей стране; описаны проблемы множественной лекарственной устойчивости эшерихий и, кратко, молекулярно-генетические механизмы устойчивости к антибиотикам разных функциональных классов. Отмечен вклад мобильных генетических элементов в распространение генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности. Также рассмотрены основные описанные на сегодняшний день факторы вирулентности диареегенных *Escherichia coli*: термолабильный и термостабильный энтеротоксины, шига-токсины двух типов, колонизирующие факторы адгезии, интимин, энтерогемолизин. Анализ литературных данных позволил соискателю обосновать необходимость получения новых сведений о фенотипах и генотипах антибиотикорезистентности и вирулентности, а также о принадлежности клинических штаммов к генетическим линиям. В конце обзора литературы диссертант приводит краткое резюме, что значительно облегчает восприятие материала.

Материалы и методы исследования. Автор излагает микробиологические, биологические, биохимические, молекулярно-генетические и биоинформационные методические приемы, с помощью

которых были решены поставленные задачи. Стоит отметить, что работа была проведена современными методами с использованием сертифицированного оборудования. Соискатель описывает рабочую коллекцию штаммов *Escherichia coli*, культивирование и хранение бактерий, видовую идентификацию, определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам, также детекцию генов антибиотикорезистентности и вирулентности, генотипирование и полногеномное секвенирование штаммов, выделение ДНК, компьютерный анализ последовательностей ДНК и геномов штаммов. Количество наблюдений, объем исследований достаточны для получения достоверных результатов.

Глава 2 посвящена описанию фенотипов и генотипов штаммов ЕТЕС, выделенных в двух крупных географически удаленных друг от друга городах России – Череповце (Центральный регион) и Владивостоке (Дальний Восток) в августе-сентябре 2011 г. и 2012 г., соответственно. Большая часть из них (18 штаммов) относились к *elt*-позитивным ЕТЕС, меньшая часть (3 штамма) - к *est*-позитивным ЕТЕС. У одного из штаммов, выделенного в г. Череповце, кроме того, описаны гены *cfaA*, *cfaB*, *cfaC* и *cfaD* субъединиц колонизирующего фактора адгезии СФА/1, отвечающего за адгезию и колонизацию патогенных эшерихий в организме человека. Автором установлена этиологическая роль энтеротоксигенных *E. coli* серогрупп O6, O25, O26, O115 и O142 в возникновении спорадических и групповых случаев пищевой инфекции среди взрослого населения Российской Федерации.

В результате анализа полученных данных диссертант отмечает появление мультирезистентных ЕТЕС, несущих одновременно гены устойчивости к АМП разных функциональных классов, что вызывает настороженность и в ближайшие годы может стать серьезной проблемой здравоохранения.

В главе 3 проанализирована вспышка пищевой инфекции, связанная с потреблением сырого молока, контаминированного шига-токсин продуцирующими *E. coli*. Диссертантом было установлено, что этиологической причиной заболевания геморрагическим колитом детей явились два ЕНЕС штамма, один из которых принадлежал к серотипу O157:H7, второй - к серотипу O101:H33. В исследованных штаммах выявлены гены основных факторов вирулентности энтерогеморрагических эшерихий: шига-токсина, энтерогемолизина, транспортных Hly-белков, глутамат декарбоксилазы, системы секреции третьего типа, сериновой протеазы и ее аутопортера, фактора повышенной устойчивости к бактерицидному действию сыворотки крови, Non-LEE кодируемого эффектора В и интимина. Показано, что штаммы *E. coli* серотипа O157:H7 относились к ранее описанному сиквенс-типу ST24 клонального комплекса ST11 (по схеме EcMLST 1.2) и сиквенс-типу ST11 клонального комплекса ST11 (по схеме «MLST Databases at UoW»), широко распространенному и характерному для *E. coli* серотипа O157:H7. Штаммы *E. coli* серотипа O101:H33 были отнесены к новому, ранее не описанному, сиквенс-типу ST145 (по схеме EcMLST 1.2) и к сиквенс-типу ST330 клонального комплекса ST10 (по схеме «MLST Databases at UoW»). Полученные в работе результаты расширяют наши знания о биологии возбудителей геморрагического колита у людей и указывают на необходимость совершенствования диагностики этой болезни.

В главе 4 описано исследование коллекции изолятов *E. coli*, выделенных в г. Ярославле в 2015-2016 гг. от 97 детей возраста до 5 лет с клиническими проявлениями острой кишечной инфекции, пищевой токсикоинфекции, гемоколита и диареи неясной этиологии. В ходе изучения коллекции диареегенных штаммов была определена их принадлежность к четырем патогруппам, а именно: энтерогеморрагическим, энтеропатогенным, энтеротоксигенным и энтероаггративным *E. coli*. Наиболее

представленными среди них были штаммы ЕНЕС и ЕРЕС. Установлено, что большинство из них принадлежат к серогруппе O26, что подтверждает клиническую значимость эшерихий данного серотипа. Установлено, что некоторые штаммы ЕРЕС и ЕНЕС проявляли фенотип множественной лекарственной устойчивости - были одновременно устойчивы к трем и четырем функциональным классам антимикробных препаратов. Особое внимание обращает на себя энтероагрегативный штамм *E. coli* серогруппы O25, выделенный от ребенка трех месяцев, который оказался устойчивым к препаратам шести функциональных классов, то есть был мультирезистентным. Таким образом, показано значительное биологическое разнообразие диареогенных штаммов *E. coli*, выделенных от детей с клиническими проявлениями диареи.

В Главе 5 описан оптимальный алгоритм индикации и выделения диареогенных *E. coli* с использованием полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией и специфической иммуномагнитной сепарации. Данный подход позволяет проводить экспресс-индикацию и выделение чистых культур диареогенных *E. coli* из клинического материала и продуктов питания. Разработанная методика была апробирована в ходе межлабораторных исследований по детекции шига-токсин продуцирующих *E. coli* (STEC), в ходе которых было выделено 46 штаммов диареогенных *E. coli*.

В **Заключении** соискатель анализирует и обсуждает данные, полученные в ходе исследования, сопоставляя их с литературными данными.

Выводы диссертации четко сформулированы, закономерны, научно обоснованы и аргументированы; логически вытекают из поставленной цели и задач исследования. Они соответствуют представленным данным, отражают

все этапы продвижения к цели исследования и полностью соответствуют поставленной цели и задачам.

Соответствие специальности. Работа написана хорошим литературным языком, достаточно иллюстрирована таблицами и рисунками. Содержание диссертации соответствует специальности 03.02.03 – микробиология, по которой она представляется к защите. Автореферат и опубликованные работы отражают основные положения и выводы диссертации.

Знание современной литературы, использование современных методов исследования, достаточный объем проведенных исследований позволили автору провести глубокий анализ полученных данных, обосновать и представить новые научные положения. Принципиальных замечаний по диссертации нет. В рукописи имеются отдельные стилистические погрешности, которые не влияют на положительную оценку работы.

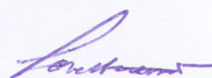
Заключение

Таким образом, диссертационная работа Карцева Николая Николаевича на тему «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика энтеротоксигенных и шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2011-2016 гг» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора ветеринарных наук, профессора Светоча Эдуарда Арсеньевича и кандидата биологических наук Фурсовой Надежды Константиновны, содержащей новое решение актуальной научной задачи – изучение энтеротоксигенных и шига-токсин продуцирующих эшерихий, имеющей существенное значение для микробиологии.

Диссертационная работа Карцева Николая Николаевича «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика энтеротоксигенных и шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2011-2016 гг», представленная на

соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335, от 02 августа 2016 г. №748, от 29 мая 2017 г. №650, от 28 августа 2017 г. №1024 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Карцев Николай Николаевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой микробиологии
и вирусологии Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Астраханский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

 Рубальский Олег Васильевич

Адрес: 414000, г. Астрахань, Бакинская, 121
Телефон: +7 (8512) 52-41-43 Факс: +7 (8512) 39-41-30
e-mail: agma@astranet.ru

16.03.2018

