

Отзыв

официального оппонента, члена-корреспондента Российской академии наук, доктора медицинских наук Суворова Александра Николаевича на диссертационную работу Макаровой Марии Александровны на тему «Гетерогенность популяции патогенных *Escherichia coli* – возбудителей кишечных инфекций и заболеваний внекишечной локализации», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Изучение кишечных бактерий неслучайно занимает одно из центральных мест в медицинской бактериологии. С давних пор с кишечной палочкой (*Escherichia coli*, *E. coli*) ассоциировался диарейный синдром, а сама эшерихия, как индигенный обитатель кишечника, рассматривалась в качестве чуть ли не основного его обитателя. С открытием ПЦР и высокопродуктивного секвенирования нового поколения представления о роли и месте *E. coli* в качестве возбудителя острых кишечных заболеваний и в качестве представителя кишечной микробиоты несколько изменилось, однако, научный интерес к данной бактерии не только не исчез, но и приобрел новые формы и значение. Если в основе исследований в данном направлении, положившим начало систематике *E. coli* и вызываемых ими заболеваний, был положен серологический анализ, который не теряет популярности и в настоящее время, то в настоящее время все более актуальным становится молекулярно-генетическая характеристика, изучение генов патогенности и сиквенс-типов штаммов данной бактерии. Во многом, интерес к энтеробактериям поддерживает высокий процент, вызываемых ими заболеваний, в общей структуре инфекционной патологии, причем, если в результате эффективных профилактических мер или эффективных подходов к терапии, ряд инфекций удастся успешно контролировать, то заболевания, вызванные *E. coli*, остаются распространенными и часто, крайне опасными. Во многом это связано с фактом широкого применения антибиотиков в клинической практике, что способствовало формированию высокопатогенных мультирезистентных бактериальных штаммов – «супербактерий».

Изменения в структуре кишечных инфекций, вызванных *E. coli*, создали определенный вакуум научных знаний о данной бактерии и обусловили необходимость изменения критериев в оценке *E. coli* в качестве возбудителя и обновления мер эпидемиологического надзора. Это касается многих стран мира

и крайне актуально для России, имеющей обширные границы со странами с более высоким уровнем заболеваемости.

В этой связи диссертация Макаровой М.А. представляется крайне актуальной и важной.

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

Новизна представленных результатов обусловлена глубиной и масштабностью исследования биологических и генетических свойств патогенных штаммов *E. coli*. В ходе исследования автор ставит и находит решения целого пласта вопросов, касающегося диагностики в России инфекций, обусловленных *E. coli*. Важно, что автор проанализировала существенное количество штаммов *E. coli*, выделенных в России из самых различных источников с привлечением широчайшего набора методов бактериологического анализа. Это особенно важно для данной работы, так как одним из существенных заключений по работе стало как раз заключение автора о недостаточности серологической идентификации бактерий для проведения эпидемиологического надзора. Приятно, что автор использовал для анализа огромное количество наборов ДНК-праймеров, что позволило охарактеризовать собранную коллекцию штаммов наиболее полно. Из приведенных результатов анализа становится, очевидно, что каждая из патогрупп *E. coli* характеризуется превалированием тех или иных генов вирулентности. Однако гены вирулентности обнаруживаются практически в каждой патогруппе. Важно также, что автор охарактеризовала наиболее полно группу EAgEC, приводящую к заболеваниям внекишечной локализации и составляющую существенную часть коллекции штаммов. Существенным достоинством и фактором новизны работы является факт анализа нормальной кишечной микрофлоры и кишечной палочки из этих образцов. Эти данные позволили сопоставить патогенетический потенциал различных штаммов *E. coli*.

Одной из задач, поставленных перед автором работы, стало изучение спектра антибиотикорезистентности штаммов *E. coli*, в первую очередь в части бета - лактамаз. В ходе работы выяснилось, что практически все штаммы, использованные для анализа, содержат те или иные гены устойчивости к антибиотикам. Установлено, что множественная антибиотикорезистентность наиболее часто встречается в штаммах из группы внутрибольничных инфекций.

Особенно настораживает, что данная группа штаммов в 100% случаев оказалась устойчивой к цефалоспорином III и IV поколения. Установлено, что данный тип устойчивости был часто обусловлен общим механизмом экспрессии бета-лактамаз расширенного спектра – CTX-M-15, встречающимся у штаммов с высоким риском пандемического распространения. Характерно, что кишечные палочки, изолированные из микробиоты здоровых лиц, оказались носителями генов лекарственной устойчивости, а 33,7% штаммов, проанализированных в данной работе, - носителями сразу нескольких генов устойчивости к антибиотикам. При этом в микробиоте здоровых лиц обнаруживаются и *E. coli* содержащие множественные гены вирулентности, свойственные штаммам – возбудителям кишечных и внекишечных инфекций.

Поэтому заключение диссертанта о том, что колонизация здоровых лиц штаммами *E. coli* с высоким патогенным потенциалом, в качестве скрытого резервуара инфекций мне представляется наиболее важным научным выводом данной работы.

Существенным выводом работы является и факт обнаружения в составе Российской коллекции штаммов, соответствующих международным клонам высокого риска пандемического распространения.

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

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Диссертационная работа Макаровой М.А. имеет высокую теоретически обоснованную и практическую значимость в лабораторной диагностике заболеваний, обусловленных *E. coli*. Полученные результаты о характеристике патогенных для человека штаммов *E. coli* по антигенным и вирулентным свойствам, эпидемически и клинически значимых клональных комплексах расширяют знания в области медицинской микробиологии и эпидемиологии. Автором научно обоснованы 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. Практическая значимость, полученных результатов Макаровой М.А., определяется возможностью их использования в повседневной практике

лабораторий центров гигиены и эпидемиологии, практического здравоохранения и иного другого подчинения при диагностике заболеваний эшерихиозной этиологии; молекулярно-генетическом мониторинге возбудителей и облигатных представителей нормобиоты кишечника; оптимизации методов детекции клональной принадлежности; профилактики осложнений заболеваний желудочно-кишечного тракта и внекишечной локализации.

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

Достоверность данных, представленных в диссертации, не вызывает сомнения, поскольку они были получены при использовании современных методологических подходах и адекватных методов исследования и обработки полученных результатов. Диссертант полностью решила поставленные задачи, соответствующие цели, что отражено в обоснованных выводах исследования. Полученные автором результаты согласуются с научной литературой в данной области, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов. Изложенные автором научные положения, сформулированные выводы и практические рекомендации свидетельствуют о высокой достоверности и логически вытекают из результатов исследований.

Результаты исследований представлены и обсуждены на международных и всероссийских конгрессах и конференциях. По теме диссертации опубликовано 60 печатных работах, из них 26 статей в рецензируемых изданиях. Получен один патент на изобретение и семь свидетельств о регистрации баз данных. Материалы диссертации вошли в отдельные главы Национального руководства «Клиническая лабораторная диагностика» и двух справочников «Лабораторная диагностика инфекционных болезней».

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

В целом структура работы является традиционной, занимает 251 страницы машинописного текста, содержит 45 таблиц и 15 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы. Существенно, что в диссертации имеется 12 приложений, содержащих ценнейшие фактические данные, иллюстрирующие

научную ценность работы. 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 соответствуют требованиям ВАК Минобрнауки РФ.

Во **введении** представлены актуальность проблемы, степень разработанности темы, цель, задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Материалы и методы изложены достаточно подробно, что позволяет объективно оценить объем работ и глубину исследования. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность полученных результатов. Приведены сведения о личном вкладе автора, апробации основных результатов исследования и полноте представления в публикациях.

Диссертационная работа включает широкий **обзор литературы** с цитированием более 350 российских и иностранных источников. Достаточный объем ссылок относится к недавним научным исследованиям. В обзоре автор подробно дает современное представление о биологических свойствах *E. coli* – возбудителей заболеваний кишечной и внекишечной локализации, представителей микробиоты кишечника. Проведенный автором критический анализ современной литературы, позволяет составить представление не только об актуальности темы исследования, но и о нерешенных вопросах лабораторной диагностики заболеваний эшерихиозной этиологии. Считаю, что обзор вполне может быть опубликован как отдельная обзорная статья.

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

В **главе 2** «Характеристика биологических свойств штаммов *E. coli* – возбудителей острых кишечных инфекций» описаны фенотипы и генотипы энтеропатогенных, энтеротоксигенных, энтероинвазивных, шигатоксин-продуцирующих и энтероаггративных *E. coli*, выделенных от больных с диарейным синдромом. В результате анализа полученных данных автор делает заключение, что в РФ в 2014-1018 гг. диарейные заболевания детей и взрослых были обусловлены штаммами диареегенных *E. coli*, которые принадлежали к разным филогенетическим группам, характеризовались широким разнообразием антигенных вариантов, наличием основных и дополнительных генов вирулентности, кодирующих факторы патогенности, имеющие клиническое и

эпидемиологическое значение. Полученные результаты расширяют наши знания о биологии возбудителей острых кишечных инфекций, а также неопровержимо указывают на то, что важным условием эффективности культурального метода исследования испражнений является адекватный выбор молекулярных методов детекции всех патогрупп диареегенных *E. coli*.

Глава 3 посвящена изучению штаммов *E. coli*, вызывающих гнойно-септические заболевания, включая инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. По результатам детекции 17 генов вирулентности автор показал, что для возбудителей этого патотипа *E. coli* характерна широкая генетическая гетерогенность патогенного потенциала. Диссертант указывает на то, что использование молекулярных методов позволяет не только подтвердить этиологическую значимость штаммов *E. coli*, но и выявлять маркеры риска развития хронического течения болезни и/или острых жизнеугрожающих состояний.

В **главе 4** автор приводит оценку комплексного анализа изучения штаммов *E. coli*, выделенных из испражнений взрослых жителей Санкт-Петербурга без признаков острых и хронических заболеваний ЖКТ. В ходе изучения 499 штаммов было определено, что 38,7% штаммов имели высокий потенциал развития заболеваний внекишечной локализации, в частности ИМП (инфекции мочевыводящих путей). Наиболее важным результатом этой главы являются данные о колонизации кишечника здорового человека штаммами, принадлежащими к международному клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131 – возбудителю заболеваний внекишечной локализации, в частности, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Полученные результаты, позволили автору сделать заключение о том, что углубленное изучение штаммов *E. coli*, колонизирующих кишечник человека необходимо использовать для совершенствования методов прогнозирования, ранней клинической диагностики и профилактики инфекционных заболеваний внекишечной локализации.

В **главе 5** автором проанализированы результаты изучения чувствительности и резистентности к антимикробным препаратам штаммов *E. coli*, выделенных от больных и здоровых лиц. В результате анализа полученных данных диссертант отмечает появление полирезистентных штаммов во всех субпопуляциях патогенных *E. coli*, а также у 33,7% штаммов, входящих в состав микробиоты кишечника, что вызывает серьезную озабоченность.

Молекулярными методами установлено, что в каждой субпопуляции *E. coli* резистентность к цефалоспорином III и IV поколения была обусловлена единым (общим, глобальным) механизмом – продукцией бета-лактамаз расширенного спектра генетического семейства СТХ-М, а также появлением штаммов (43,0%), содержащих до четырех генов бета-лактамаз различных классов. Полученные результаты позволили сделать автору заключение о необходимости проведения на национальном уровне постоянного мониторингового контроля за резистентностью популяции патогенных и комменсальных *E. coli*.

В главе 6 автором приведены и обоснованы систематические и случайные «ошибки» интерпретации результатов лабораторных исследований, проведенных культуральным методом, при обосновании этиологической значимости штаммов *E. coli* трех серологических групп O6, O25 и O144 как возбудителей острых кишечных инфекций. Молекулярным методом было установлено, в изученных штаммах отсутствовали генетические маркеры вирулентности возбудителей диарейных заболеваний, в тоже время штаммы *E. coli* O6 по набору генов вирулентности принадлежали к возбудителям заболеваний внекишечной локализации, в частности инфекций мочевыводящих путей; *E. coli* O25 - к пандемическому клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131 – возбудителю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. По результатам полногеномного секвенирования штаммы *E. coli* O144 относились к новому непатогенному серологическому варианту O144:H45 (патент RU 2707640 C1). Полученные результаты позволили автору сделать заключение, что адекватный выбор молекулярных методов детекции диареогенных *E. coli*, является важным условием эффективности культурального исследования проб испражнений, так как этиологическая значимость разных клинических форм заболеваний, обусловленных *E. coli*, определяется наличием генов вирулентности у конкретного штамма возбудителя.

В разделе «**Заключение**» проанализированы полученные результаты, дана их оценка с использованием сведений научной литературы, подчеркнута их теоретическая и практическая значимость. Данные литературы также дали возможность Макаровой М.А. обосновать и объяснить собственные результаты исследований, что демонстрирует заключение диссертации. Диссертационную работу завершают девять **выводов**, которые полностью соответствуют

поставленной цели и задачам, соответствуют ее содержанию и базируются на принципах доказательной медицины.

В разделе «**Практические рекомендации**» определены десять предложений, которые могут представлять интерес для научного сообщества, специалистов практического здравоохранения и эпидемиологической службы и в перспективе могут быть внедрены в лаборатории центров гигиены и эпидемиологии, практического здравоохранения, иного другого подчинения.

Таким образом, диссертационная работа Макаровой Марии Александровны может быть квалифицирована как завершённое исследование, которое по научно-практической значимости, объёму исследований, новизне и ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационного исследования.

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.

В процессе ознакомления с диссертацией у меня возникло несколько вопросов.

1. Так при анализе 499 штаммов, выделенных из испражнений условно здоровых людей, автор указывает, что эти штаммы не содержали генов вирулентности DEC. Однако, далее отмечается, что 38,7% из них содержали гены вирулентности EхPEC в геноме которых обнаруживаются гены альфа гемолизина и цитонекротического фактора. Возникает вопрос, неужели в геноме штаммов DEC данные гены не встречаются?
2. Если серодиагностика в целом ряде случаев не позволяет достоверно охарактеризовать штамм *E. coli* возникает вопрос, возможно ли полностью

заменить О или Н идентификацию штаммов по патогруппам на их генетическую идентификацию (по генам вирулентности) и если да, то какие и сколько генов нужно включить в такой анализ.

3. В настоящее время в мире широко используется фекальная трансплантация при целом ряде кишечных патологий. Интересно узнать мнение диссертанта, насколько это безопасно, учитывая наличие генов вирулентности и антибиотикоустойчивости у штаммов кишечной палочки, полученных из микробиоты здоровых доноров

Заданные вопросы не носят принципиальный характер в плане оценки работы диссертанта и не влияют на общее заключение оппонента.

Заключение

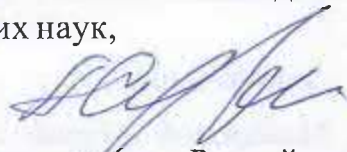
Диссертационная работа Макаровой Марии Александровны на тему «Гетерогенность популяции патогенных *Escherichia coli* – возбудителей кишечных инфекций и заболеваний внекишечной локализации» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором обширных исследований осуществлено решение важной научно-практической проблемы в области медицинской микробиологии – изучение популяционной структуры и роли кишечной микробиоты в норме и при патологии для адресной диагностики потенциально опасных возбудителей актуальных инфекций человека.

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 отделом молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; 197376, 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 член-корреспондента Российской академии наук, доктора медицинских наук, профессора
Суворова Александра Николаевича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,

доктор биологических наук



Пшенкина Надежда Николаевна

06.09.2021 г.