

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Теца Виктора Вениаминовича 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

Инфекции, вызванные патогенными *E. coli*, распространены повсеместно и имеют высокую эпидемиологическую, клиническую и социально-экономическую значимость. Заболевания, обусловленные этим патогеном, характеризуются высокой вероятности тяжелого течения с развитием осложнений, и трудностями идентификации различных патотипов и патогрупп, необходимых при выборе эффективной этиотропной терапии.

Патогенность *E. coli* не является видовым признаком и наборы генов патогенности этого микроба имеют значительные различия, включая их расположение как в хромосоме клетки, так и плазидах, транспозонах и профагах. Реализация патогенного потенциала т.е вирулентность, также имеет свой генетический контроль и может различаться на уровне конкретного штамма. Штаммы *E. coli* широко представлены в микробиоте кишечника человека и животных и выполняют полезные для макроорганизма функции. Разнообразие энтеробактерий, и горизонтальный перенос генов между представителями этого семейства бактерий способствуют клональным изменениям популяций *E. coli* в микробиоте, способствующим формированию потенциальных патогенов. Опасность таких микробиологических изменений определяется чрезвычайно широким спектром факторов вирулентности *E. coli*: эндо- и экзотоксины, адгезины экзоферменты, колицины, и др.

В настоящее время значительное внимание фиксировано на проблеме резистентности бактерий к антибиотикам. Проблема антибиотикорезистентности приобрела глобальный характер и во многих странах рассматривается как одна из угроз общенациональной безопасности. В 2017 г. ВОЗ опубликовала список 12 «приоритетных» патогенов, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. В этом списке *E. coli* с множественной устойчивостью по потребности в создании новых антибиотиков отнесены к группе микроорганизмов с критически высоким уровнем приоритетности. Быстрый рост резистентности в популяции *E. coli*

связан с распространением клонов, относящихся к «клонам высокого риска», и в первую очередь, имеющим сиквенс типа 131 (ST131).

В РФ накоплен обширный материал о биологических свойствах патогенных *E. coli*, эпидемиологических, патогенетических и клинических особенностях вызываемых ими заболеваний, однако рутинная лабораторная диагностика, основанная преимущественно на культуральных методах, не позволяет выявлять варианты возбудителей эшерихиозов с измененными свойствами.

В этой связи, диссертационная работа Макаровой Марии Александровны, посвященная комплексному изучению популяции патогенных *E. coli* с использованием молекулярно-генетических методов, позволяющих своевременно оценить клиническую и эпидемиологическую значимость выделенного штамма необходимых для своевременного выбора этиотропной терапии и проведения целенаправленных профилактических и противоэпидемических мероприятий, является важной и актуальной.

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

Направление исследований диссертационной работы Макаровой Марии Александровны носит оригинальный и принципиально новый характер. Научная новизна работы определяется, прежде всего, тем, что впервые при изучении популяции *E. coli* дана комплексная оценка биологических свойств субпопуляций *E. coli* - возбудителей острых кишечных инфекций, заболеваний внекишечной локализации, а также штаммов, колонизирующих кишечник человека. Полученные данные о гетерогенности генетических свойств и антигенной характеристике диареегенных *E. coli* существенно расширили сведения о циркулирующих на территории РФ возбудителях острых кишечных инфекций. Автором впервые выявлены и описаны штаммы энтероаггративных *E. coli*, ранее не диагностируемой патогруппы в РФ.

Впервые представлена комплексная характеристика штаммов *E. coli* - возбудителей заболеваний внекишечной локализации, свидетельствующая о генетической вариабельности патогенного потенциала. Показано, что наличие генов патогенности (*afa*, *pap*, *sfa*) является прогностическим признаком риска развития хронического течения инфекций мочевыводящих путей, генов (*kps*, *ibeA*) - острых жизнеугрожающих состояний (уросепсис, менингит).

В ходе работы впервые представлены суммарные данные о резистентности к антимикробным препаратам и механизмах устойчивости к цефалоспорином III-IV поколений и карбапенемам в популяциях патогенных и комменсальных *E. coli*. Охарактеризованы бета-лактамазы расширенного спектра, обуславливающие устойчивость к бета-лактамам. Показано, что

49,8% популяции *E. coli* характеризуются множественной устойчивостью к клинически значимым антимикробным препаратам. Полученные данные являются важным инструментом для эпидемиологических исследований при оценке общего пула генов резистентности в популяции *E. coli*. Результаты этого исследования являются важной основой контроля появления новой клинической и эпидемически значимой резистентности этих бактерий..

С использованием современных научно обоснованных принципов изучения популяционной структуры *E. coli* диссертантом установлено, 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.

Несомненной заслугой диссертанта являются исследования по изучению штаммов *E. coli*, входящих в состав микробиоты кишечника человека. Автором установлен факт колонизации кишечника здоровых лиц штаммами *E. coli* - потенциальными возбудителями заболеваний внекишечной локализации. Таким образом, показана эпидемиологическая значимость микробиоты кишечника как скрытого резервуара патогенных *E. coli* с множественной резистентностью к антимикробным препаратам.

Полученные результаты, научная обоснованность выводов и рекомендаций определяется проведенным диссертантом глубоким предварительным анализом литературы, посвященной изучаемой проблеме, а также комплексным подходом к решению проблемы, разнообразием и адекватностью методов исследования, и достаточным объемом фактического материала.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Макаровой М.А. определяется объемом проведенных исследований, адекватностью объектов исследования, соответствующих целям и задачам, общим объемом выполненной работы, адекватностью методов статистической обработки данных. Диссертант полностью решила поставленные задачи, соответствующие цели исследования, что отражено в обоснованных выводах. 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.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

В результате проведенного исследования, автором проведено теоретическое обоснование и определена практическая значимость использования комплекса культуральных и молекулярных методов при лабораторной диагностике заболеваний, обусловленных *E. coli*. Комплексный подход позволяет охарактеризовать патогенные для человека штаммы *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. 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 медицинских лабораторий, при диагностике заболеваний эшерихиозной этиологии; молекулярно-генетическом мониторинге возбудителей и облигатных представителей нормобиоты кишечника; оптимизации методов детекции клональной принадлежности; профилактики жизнеугрожающих осложнений.

Результаты диссертационной работы Макаровой М.А. учтены 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».

Практической ценностью работы являются созданные автором электронные базы данных, содержащие характеристику биологических свойств российских штаммов *E. coli*, которые 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 отражено в 60 печатных работах, в том числе в 26 статьях в рецензируемых изданиях. Получен патент на изобретение и семь свидетельств о регистрации электронных баз данных. Материалы диссертации вошли в отдельные главы Национального руководства, двух справочников, разделы четырех монографий.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Структура диссертационной работы Макаровой М.А. изложена на 251 страницах машинописного текста в традиционном стиле и включает введение, обзор литературы, пять глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список цитируемой литературы и 12 приложений. Диссертация иллюстрирована 45 таблицами и 15 рисунками. Список литературы включает 372 источника, из которых 102 – отечественных и 250 зарубежных. 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 РФ.

В разделе «**Введение**» диссертант освещает актуальность темы диссертационного исследования, формулирует его цель и задачи, приводит положения, выносимые на защиту, степень разработанности темы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Приведены сведения о личном вкладе автора, апробации основных результатов исследования и полноте представления в публикациях. Практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы приведены в

соответствующих разделах работы, выполнимы и могут быть использованы профильными специалистами. В подразделе «**Материалы и методы**» автор подробно описывает использованные в работе методы (бактериологические, иммунохроматографические, молекулярные, биоинформатические, статистические). Избранные диссертантом методы исследования являются современными, информативными, адекватными поставленным задачам и соответствующими критериям доказательной медицины. Объем исследований, проведенных на различных этапах работы, диапазон экспериментальных методик, освоенных автором диссертации, и статистической обработки, полученных данных, достаточны для получения достоверных результатов. Глава написана ясно, четко, понятно.

Первая глава «**Обзор литературы**» представляет собой обзор актуальных источников литературы, посвященных современным представлениям о биологических свойствах *E. coli* – возбудителей заболеваний кишечной и внекишечной локализации, представителей нормобиоты кишечника. Автор дает разностороннюю характеристику изучаемой проблемы, подробно описывает антигенную структуру, филогенетические группы, факторы патогенности и, кодирующие их гены, ассоциируемые с патотипами и патогруппами *E. coli* – возбудителями инфекционных заболеваний человека, механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам. Заключительный подраздел работы автор посвятил анализу методов, используемым при лабораторной диагностике заболеваний, обусловленных патогенными *E. coli*, описывая их достоинства и недостатки. Обзор написан хорошим литературным языком и читается с интересом.

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

Вторая глава посвящена характеристике биологических свойств штаммов *E. coli* – возбудителей острых кишечных инфекций и содержит пять подразделов, в которых соискатель детально описывает биологические свойства энтеропатогенных, энтеротоксигенных, энтероинвазивных, шигатоксин-продуцирующих и энтероаггративных *E. coli*, выделенных на семи административных территориях РФ. В конце главы диссертант приводит краткое резюме, что значительно облегчает восприятие данного материала. По результатам проведенного исследования автор сделал вывод о том, что включенные в исследование возбудители острых кишечных инфекций – *E. coli* различных серологических вариантов принадлежали к пяти патогруппам и обладали варибельными наборами генов, кодирующих антигены и факторы вирулентности, определяющие клиническую и эпидемиологическую значимость штаммов; энтероаггративные *E. coli*,

выделенные от пациентов с диарейным синдромом в 79,7% случаев являлись носителями кластеров генов, ассоциированных с возбудителями острых кишечных инфекций и заболеваний внекишечной локализации.

Третья глава посвящена изучению штаммов *E. coli*, вызывающих гнойно-септические заболевания, включая инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Данные детекции 17 генетических маркеров показали генетическую гетерогенность патогенного потенциала возбудителей заболеваний внекишечной локализации. Автором приводятся неопровержимые факты, что 12% штаммов, выделенных из мочи, имели маркеры неблагоприятного прогноза течения инфекций мочевыводящих путей (ИМП): 10,7% - гены *sfa* и *kpsK1*, наличие которых характерно для сепсис - ассоциированных *E. coli* (SEPEC); 1,3% штаммов – ген *ibeA*, ассоциированного с менингеальными *E. coli* (NMEC). Выявлено, что 14,9% штаммов, выделенных при ИМП, характеризовались гибридным энтероаггративным/уропатогенным генотипом. Методом MLST – типирования установлено, что 23,3% штаммов *E. coli* – возбудителей заболеваний внекишечной локализации принадлежали к международному клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131.

В четвертой главе автор приводит оценку комплексного анализа изучения штаммов *E. coli*, выделенных из испражнений взрослых жителей Санкт-Петербурга без признаков острых и хронических заболеваний ЖКТ. Диссертантом убедительно показано, что из 499 штаммов с типичными культурально-морфологическими свойствам, ферментативно-активного варианта *E. coli*, не содержащих гены патогенности, ассоциированных с возбудителями диарейных заболеваний, в 38,7% случаев имели высокий потенциал развития заболеваний внекишечной локализации, в частности ИМП. Важным результатом исследований, изложенных в этой главе являются данные о колонизации кишечника здорового человека штаммами, принадлежащими к международному клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131. Результаты, отраженные в данной главе, наглядно свидетельствуют об актуальности и важности изучения популяции синантропных *E. coli*, так как эти исследования представляют собой основу для совершенствования методов прогнозирования, ранней клинической диагностики и профилактики инфекционных заболеваний внекишечной локализации.

Пятая глава диссертации посвящена анализу и характеристике резистентности к антимикробным препаратам штаммов *E. coli*, выделенных от больных и здоровых лиц. По результатам тестирования штаммов *E. coli* к препаратам, рекомендованным для использования в качестве эмпирической терапии (стартового, первого, второго выбора) распространенных

инфекционных синдромов, а также, включенным в перечень для мониторинга резистентности, автор сделал заключение о том, что штаммы *E. coli*, выделенные от больных и здоровых лиц, характеризовались устойчивостью к большинству антибиотиков и высоким уровнем резистентности к цефалоспорином III-IV поколения, за счет ведущего механизма – продукции БЛРС идентичных классов генетического семейства СТХ-М. Полученные автором результаты свидетельствуют о необходимости постоянного мониторингового контроля за резистентностью популяции патогенных и комменсальных *E. coli*.

В **шестой главе** диссертантом на примере *E. coli* трех серологических групп O6, O25 и O144 наглядно объяснены «ошибки» постаналитического этапа лабораторного исследования при обосновании этиологической значимости штаммов как возбудителей ОКИ. Проведенные автором исследования показали, что штаммы серогрупп *E. coli* O6, O25 и O144 не имеют генов патогенности возбудителей диарейных заболеваний. *E. coli* O6 и O25 по набору генов патогенности принадлежали 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 *E. coli* O25, колонизирующие кишечник здоровых лиц, регистрируемые в практических лабораториях как «носительство энтеротоксигенных *E. coli*», принадлежали к пандемическому клону высокого риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131 – возбудителю заболеваний внекишечной локализации. Автор приходит к заключению, 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 патогенности у конкретного штамма возбудителя.

В разделе **«Заключение»** проанализированы полученные результаты, дана их оценка с использованием сведений научной литературы, подчеркнута их теоретическая и практическая значимость. **Выводы** работы достоверны, убедительны, полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Диссертационная работа Макаровой М.А. несомненно представляет интерес для научного сообщества, специалистов практического здравоохранения и эпидемиологической службы. В разделе **«Практические рекомендации»** определены предложения, 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, которое по научно-практической значимости, объему исследований, новизне и ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

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.

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

1. Как Вы оцениваете вероятность возникновения заболеваний, связанных с разрушением *E. coli*, представленных в нормальной микробиоте?
2. Как Вы оцениваете риски для здоровья, определяемые наличием ExPEC в микробиоте кишечника?

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 патогенных *E. coli* в развитии кишечных и внекишечных заболеваний.

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 микробиологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России)

Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8; тел.: 8 (812) 338-71-53 e-mail: vtetzv@yahoo.com

доктор медицинских наук, профессор

Теца Виктор Вениаминович

Подпись доктора медицинских наук, профессора
Теца Виктора Вениаминовича заверяю



21 сентября 2021