

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Виктора Николаевича Царева
на диссертационную работу Самойловой Анны Андреевны
«Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных
штаммов *Klebsiella pneumoniae*»,

представленную на соискание степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность избранной темы

Неуклонный рост устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам является проблемой общемирового масштаба – на неё обращают внимание как документы ВОЗ, так и внутренние нормативные акты Российской Федерации, в частности, программа СКАТ/Стратегия контроля антимикробной терапии при оказании стационарной медицинской помощи, разработанная под руководством ведущих учёных в этой области – академика РАН профессора Н.И. Брико, чл.-корреспондентов РАН Р.С. Козлова, С.В. Сидоренко и других. Штаммы *K. pneumoniae* входят в группу наиболее распространенных патогенов с высоким уровнем устойчивости, которая обозначается как «ESKAPE-патогены» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*). Возбудители ESKAPE являются наиболее важными причинами кризиса антибиотикорезистентности, именно поэтому *K. pneumoniae* отнесены ВОЗ к группе возбудителей с «критически высоким уровнем приоритетности» по необходимости в создании новых антибиотиков.

В настоящее время выделяют две эволюционно сложившиеся линии *Klebsiella pneumoniae*, отличающиеся по степени вирулентности. Первую представляют так называемые классические штаммы, которые чаще ассоциированы с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), и характеризуются выраженной резистентностью к антимикробным препаратам (АМП), вторую — вирулентные, которые являются причиной ИСМП и часто обладают гипермукоидным фенотипом.

Гипервирулентные клебсиеллы характеризуются наличием генетических факторов, ассоциированных с гипермукоидным фенотипом, полисахаридной капсулой K1, K2, K5 и/или молекулярными системами усвоения железа (сидерофоры). Инфекционный процесс, обусловленный гипервирулентными штаммами, проявляется в виде bacteriemia, которая характеризуется быстрым метастатическим распространением, приводящим к множественным инфекциям различных органов и тканей.

В последние годы скорость формирования клебсиеллами резистентности к основным группам АМП существенно увеличилась и достигла пандемического масштаба. Проблема устойчивости к АМП возбудителей инфекционных заболеваний человека, в том числе *K. pneumoniae*, продолжает обостряться и является серьезнейшей угрозой для мирового здравоохранения, требует превентивных действий во всех государственных сферах. Информация о фенотипах и генотипах *K. pneumoniae* проводится во всех ведущих клинических центрах и профильных госпитальных диагностических лабораториях, что позволяет проводить непрерывный мониторинг за резистентностью и может использоваться для разработки и/или пересмотра клинических рекомендаций и стандартных протоколов лечения заболеваний, обусловленных штаммами *K. pneumoniae*. Ввиду того, что *Klebsiella spp.* является одной из наиболее распространенных причин как нозокомиальных, так и внебольничных инфекций, включая инфекции мочевыводящих путей, bacteriemia, пневмонию, неонатальный абсцесс, гнойный абсцесс печени и др., обоснование их этиологической значимости при патологических состояниях даже при массивности выделения, является сложной задачей и требует углубленного изучения их факторов патогенности.

Таким образом, изучение фенотипических и генотипических свойств бактерий рода *Klebsiella*, представленное в настоящей работе, безусловно, является актуальным и перспективным направлением научного поиска и имеет несомненное практическое приложение.

Достоверность и новизна полученных результатов.

Достоверность полученных результатов, выводов и положений не вызывает сомнений и подтверждается использованием достаточного количества экспериментов, современных методов исследования, соответствующих поставленным задачам, воспроизводимостью результатов и применением методов статистического анализа. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению, состоит из структурированного обзора литературы, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 18 рисунками.

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

Поставленные и выполненные автором цель и задачи исследования в полной мере реализованы в представленной А.А. Самойловой диссертационной работе «Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*».

Положения и выводы диссертационной работы обоснованы полностью раскрытой целью научного исследования и выполненными задачами, поставленными для ее достижения. Для корректной постановки цели исследования автором диссертационной работы проанализирован достаточный объем литературных источников (20 отечественных и 169 зарубежных). Все данные, полученные в ходе выполнения задач исследования, подвергнуты глубокому теоретическому анализу. Положения, выносимые на защиту, и полученные выводы имеют логическое подтверждение в тексте и иллюстрированы таблицами и рисунками. Каждое положение и вывод имеют смысловое и фактическое обоснование и логично связаны между собой единой целью исследования.

Практические рекомендации четко прописаны в соответствующем

разделе работы, выполнимы и могут быть использованы специалистами учреждений различного профиля: научного и лечебно-профилактического.

Ценность для науки и практики результатов работы:

На основании полученных данных, дано теоретическое обоснование значимости и целесообразности использования молекулярных методов изучения *K. pneumoniae*, которые позволяют охарактеризовать, выделенный штамм по вирулентным свойствам. Сведения о классических и гипервирулентных штаммах дают возможность выявлять потенциальных возбудителей заболеваний внекишечной локализации, включая ИСМП. Созданные базы данных позволят повысить эффективность микробиологического мониторинга за клебсиеллами, а также способствовать корректировке схем эмпирической терапии, заболеваний, обусловленных резистентными штаммами, в зависимости от данных локального мониторинга.

Разработанная и предложенная автором тест-система для оценки степени вирулентности и резистентности штаммов *K. pneumoniae*, позволяет дифференцировано подойти к оценке патогенного потенциала конкретного штамма и способствует назначению адекватной антимикробной терапии.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность.

Материалы диссертационной работы изложены на 137 страницах печатного (компьютерного) текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы из 189 источников, в том числе 20 – отечественных и 169 зарубежных исследователей, а также приложений, в которых представлены свидетельства о регистрации геномных баз.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность проблемы, раскрываются цели и задачи исследования, обозначается научная новизна, теоретическая и практическая значимость, перечисляются материалы и методы исследования, формулируются тезисы, подлежащие защите,

подтверждается достоверность исследования и представляется информация о проверке результатов исследования.

В первой главе автор проводит обзор отечественных и зарубежных исследований по исследуемой теме, включающий морфологические и культуральные свойства штаммов *K. pneumoniae*, а также клиническую значимость инфекций, вызванных данным микроорганизмом. Автор описывает генетические детерминанты вирулентности клебсиелл и приводит сравнительную характеристику классических и гипервирулентных штаммов. Во введении представлены 3 таблицы, в которых фактически дан подробный сравнительный мета-анализ, раскрывающий генетические особенности вирулентности и устойчивости к АМП, их функции и методы оценки чувствительности к АМП.

Во второй главе представлены материалы, методы и объем проведенных исследований. Автор провел работу с 285 бактериальными изолятами, выделенными из биологического материала стационарных пациентов, изучил чувствительность бактерий к 9 АМП фенотипическими методами, провел детекцию генов вирулентности молекулярно-генетическими методами. Для 85 штаммов было проведено полногеномное секвенирование, а 30 штаммов исследовано на биологической модели заражения модельных животных.

В третьей главе представлена фенотипическая и генотипическая характеристика антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*. В результате фенотипического исследования, чувствительными ко всем тестируемым препаратам были 8,2 % штаммов, устойчивость к карбапенемам проявляли 64,7 % изолятов, а к колистину - 23,5 %. По результатам полногеномного секвенирования генетические детерминанты резистентности к группе аминогликозидов были выявлены для 76,0 % изолятов, к группе фениколов - для 71,7 %, к триметоприму – для 70,7 % штаммов. Наличие генов β -лактамаз расширенного спектра выявлено в 57,7% штаммов, а карбапенемаз - в 60,2 %. Наиболее распространены среди карбапенемаз были гены OXA-48

NDM-1, которые были обнаружены в 18,8 % и 17,6 % штаммов соответственно.

В четвертой главе представлена фенотипическая и генотипическая характеристика вирулентности штаммов *K. pneumoniae*. Среди исследованных изолятов *K. pneumoniae* по результатам фенотипического «стринг-теста» было выявлено 67,1 % штаммов с классическим фенотипом и 32,9 % штаммов с гипермукоидным фенотипом. В результате полногеномного секвенирования были идентифицированы характерные для гипервирулентных штаммов ST-типы: ST23 (18,8 %), ST307 (7,0 %), ST86, ST11 (1,2 %), ST65 (1,2 %) и капсульные типы: K1 (8,2 %), K2 (24,7 %), K20 (2,4 %), K57 (10,6 %), K64 (2,4%)

В пятой главе приведено изучение вирулентных штаммов *K. pneumoniae* на биологической модели (белые аутбредные мыши). Гипервирулентные штаммы (по результатам биологической пробы) с капсульным типом K2 принадлежали к сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65 и были выделены от пациентов с флегмоной рубца, панкреатитом, некротической раной культи ($LD_{50} 1 \times 10^1$ КОЕ), а также синовитом коленного сустава и флегмоной поясничной области ($LD_{50} 1 \times 10^2$ КОЕ). Во всех hvKp изолятах присутствовали гены *rmpA*, *rmpA2*, ген, кодирующий синтез сидерофора аэробактина (*iucI*), и гены *peg-344* и *wzyK2*. Показана чувствительность и специфичность совокупности признаков вирулентности по результатам статистической обработки данных.

В шестой главе представлена разработка экспрессного способа оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* на основе универсальной платформы для микрочиповой ПЦР-амплификации.

Работа завершается заключением и 5-ю выводами, которые логически вытекают из результатов собственных исследований и обобщают весь объем информации.

В заключении отражены перспективы дальнейших исследований и практические рекомендации.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 20 научных работ, из них 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК и РUDN, и 5 - в изданиях, входящих в международные базы данных, а также 3 свидетельства о регистрации баз генетических данных.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации.
Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации. Хорошо иллюстрирован таблицами (4) и рисунками (3). Диссертация и автореферат Анны Андреевны соответствует всем правилам написания и оформления соответствующих научных работ, установленным в нормативных документах ВАК и Положения РUDN.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.
Автором исследования достигнута цель – разработан экспресс-метод оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*, усовершенствована и пополнена новыми геномными данными доказательная база генетических исследований на основе использования современных методов масс-спектрометрии, полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа, охарактеризованы гены и плазмиды, контролирующие факторы вирулентности и резистентности к АМП. Диссертация написана корректным научным языком, текст работы изложен грамотно и логично, иллюстрирован таблицами и рисунками.

Принципиальных недостатков в содержании и оформлении диссертации не выявлено. Имеются отдельные стилистические неточности и опечатки, которые не умаляют научной значимости и ценности работы.

Вместе с тем возникло несколько вопросов для дискуссии:

1. Известно, что сидерофоры достаточно хорошо представлены у бактерий *K. pneumoniae*. Каково их значение и какова частота по Вашим данным?
2. Чем Вы объясните взаимосвязи при выявлении генов вирулентности и резистентности, полученные в вашем исследовании?

Заключение

Диссертационное исследование Самойловой Анны Андреевны «Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи – разработки экспрессного способа оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного ученым советом, протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Самойлова Анна Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

Заслуженный деятель науки Российской Федерации,
заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии
ФГБОУ ВО «Российский университет медицины»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор
03.00.07 – микробиология



Царев Виктор Николаевич

« 4 » апреля 2025 г

Подпись профессора Царева В. Н. заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Российский университет медицины»
Минздрава России

Заслуженный работник высшей школы РФ
доктор медицинских наук, профессор



Васюк Юрий Александрович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес организации: 127006, г. Москва, ул. Долгоруковская, д.4
+7 (495) 609-67-00; e-mail: mail@msmsu.ru, rosunimed.ru