

ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора РАН, доктора медицинских наук, заведующего микробиологической (бактериологической) лабораторией – врача бактериолога Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации Попова Дмитрия Александровича на диссертацию Садеевой Зульфиры Закиевны «Характеристика грамотрицательных бактерий, выделенных из крови и ликвора у детей», на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность выбранной темы

Бактериемии и инфекции центральной нервной системы (ЦНС), ассоциированные с грамотрицательными бактериями, представляют собой значимую угрозу для системы здравоохранения в связи с высокой смертностью и значительными экономическими затратами на лечение и реабилитацию пациентов.

В последние годы наблюдается рост как частоты бактериемии и инфекций ЦНС, ассоциированных с грамотрицательными патогенами, так и устойчивости к противомикробным препаратам этих возбудителей.

Знание наиболее распространенных бактериальных этиологических агентов и их чувствительности к антибиотикам имеет решающее значение при выборе эмпирической терапии при инфекциях кровотока и ЦНС для улучшения результатов их лечения.

Неэффективность лечения инфекций грамотрицательной этиологии, связанных с оказанием медицинской помощи, может быть обусловлена высокой частотой встречаемости у данных бактерий β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и/или резистентности к карбапенемам. По данным литературы одними из наиболее распространенных факторов риска смертности у пациентов с инфекциями кровотока и ЦНС являются тяжесть основного заболевания, пребывание в отделении реанимации интенсивной терапии, инфицирование штаммом с БЛРС или карбапенем-резистентным и задержка в назначении соответствующей терапии, в то время как контроль источника инфекции и ранняя успешная антимикробная терапия были связаны с лучшей выживаемостью. Это свидетельствует о необходимости мониторинга распространения карбапенемаз у грамотрицательных микроорганизмов и учета этих данных при назначении терапии.

Для разработки новых методов лечения крайне важно определить факторы приспособленности и вирулентности, которые необходимы для развития бактериемии и могут иметь отношение к инфицированию человека. За большинство случаев грамотрицательной бактериемии, ответственно небольшое количество видов, включая *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Эти микроорганизмы демонстрируют общие и уникальные патогенные механизмы, такие как образование капсулы, выработку адгезинов и метаболическую изменчивость, некоторые виды способны к продукции различных токсинов.

В связи с вышеизложенным, диссертационное исследование Садеевой Зульфири Закиевны, направленное на изучение популяционной структуры и молекулярно-генетических маркеров антибиотикорезистентности и вирулентности у грамотрицательных бактерий, выделенных из образцов крови и ликвора у детей, является актуальным, а результаты представляют существенный научный и практический интерес.

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

Диссертационное исследование Садеевой Зульфири Закиевны представляет собой законченное комплексное научное исследование, выполненное на высоком теоретическом и методологическом уровне. Сформулированные цель и задачи, разработанный дизайн исследования основаны на анализе большого числа отечественных и зарубежных литературных источников. Научные выводы соответствуют поставленным цели и задачам, базируются на достаточном объеме выборки и отражают результаты собственных исследований, что подтверждает обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Достоверность научных положений и выводов основана на использовании методов, соответствующих поставленным задачам.

Автором получены новые сведения о популяционной структуре *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. marcescens*, выделенных из проб крови и ликвора у детей. Было определено, что преобладали международные генотипы высокого эпидемического риска, такие как ST1104^{Oxf}, ST450^{Oxf} у *A. baumannii*, ST307, ST395 у *K. pneumoniae*, ST654 и ST235 у *P. aeruginosa*.

Был успешно применен метод сиквенсового анализа для изучения генотипического состава изолятов *S. marcescens* из клинического биоматериала.

Автор актуализировала данные о преобладающих генетических детерминантах устойчивости к карбапенемным антибиотикам: *A. baumannii* – сериновая карбапенемаза ОХА-40, *K. pneumoniae* – сериновая карбапенемаза ОХА-48, *P. aeruginosa* – металло-β-лактамаза VIM, *S. marcescens* – комбинация сериновой карбапенемазы ОХА-48 и металло-β-лактамазы NDM.

Были получены новые данные об интенсивности формирования биопленок на абиотической поверхности грамотрицательными бактериями, выделенными из образцов крови и ликвора. По результатам исследования значительная часть изолятов *K. pneumoniae* и *S. marcescens* формировала биопленки умеренной плотности. В то же время изоляты *A. baumannii* чаще образовывали биопленки слабой интенсивности, а большинство штаммов *P. aeruginosa* проявляли способность к формированию биопленок высокой плотности.

Автором были получены новые данные о вирулентных свойствах *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Установлено, что все изоляты *A. baumannii* имели гены: биопленкообразования (*bfpR*, *bap*), каталазы (*katE*). Ген белка наружной мембраны (*ompA*) обнаружен у 94% штаммов, ген пилей шаперон-ашерной системы (*csuA/B*) – у 88%. Все клинические изоляты *K. pneumoniae* имели гены сидерофора энтеробактина (*entB*) и фимбрий (*mrkD*). Гены сидерофоров иерсиниебактина (*ybtS*) и аэробактина (*iutA*) были обнаружены у 78% и 18% соответственно. Ген системы утилизации трехвалентного железа (*kfu*) встречался у 3% штаммов. Капсульный серотип K2 определен у 10% изолятов *K. pneumoniae*. Все изоляты *P. aeruginosa* имели гены гидролаз (*lasB*, *plcH*, *aprA*). Гены альгината (*algD*) и пиоцианина (*phzM*) выявлены у 96% и 92% штаммов, соответственно. Гены нейраминидазы встречались с частотой от 4% (*nanI*) до 60% (*nan2*). Гены пилей (*pilA* и *pilB*) выявлены у 12% и 48% штаммов соответственно.

В результате изучения генетических причин устойчивости к полимиксидам у изолятов *K. pneumoniae* из крови и ликвора было определено, что характерными являются изменения в гене *PhoP_26Q*.

При оценке исходов бактериемии и инфекции ЦНС, ассоциированных с *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* или *S. marcescens* было выявлено, что уровень смертности составляет от 5 до 25% случаев. Характерным оказалось то, что этиологические агенты инфекции кровотока/ЦНС при неблагоприятных исходах относились к категории МЛУ/ШЛУ и обладали большим разнообразием генетических детерминант резистентности и патогенности.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты диссертационной работы Садеевой З.З., несомненно, представляют значительный научный и практический интерес. Данные о популяционном составе и молекулярно-генетических маркерах антибиотикорезистентности у грамотрицательных бактерий имеют ценность для фундаментальной науки, вносят вклад в понимание особенностей развития инфекций кровотока и ЦНС у педиатрических пациентов.

Данные, полученные в ходе определения чувствительности к антибактериальным препаратам методом микроразведений в бульоне, в результате определения генов резистентности методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, а также в процессе полногеномного исследования, имеют важное практическое значение для назначения своевременной и адекватной антибактериальной терапии пациентам с инфекциями кровотока и ЦНС.

Полученные автором данные о факторах вирулентности грамотрицательных бактерий подчеркивают необходимость дальнейших исследований в этой области для формирования более четких и глубоких представлений о роли вирулентности бактерий в патогенезе бактериемии и инфекций ЦНС, а также поиска возможных вариантов использования этих данных для разработки новых лекарственных препаратов и тест-систем.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры педиатрии и общественного здоровья института подготовки медицинских кадров ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России при освоении основной профессиональной образовательной программы высшего образования, а также в лечебный процесс отделения анестезиологии и реанимации, отделения гнойной хирургии и нейрохирургического отделения ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии».

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа Садеевой З.З. соответствуют паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология, что определяется направлением исследований (п. 1. Систематика и филогения микроорганизмов, п. 7. Ферменты микроорганизмов, п. 11 Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ, п. 15. Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки).

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По результатам диссертационного исследования автором была опубликована 21 работа, в том числе: 4 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, в том числе, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer, 2 иные публикации по результатам исследования, 15 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них двух зарубежных конференций).

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Садеевой З.З. выполнена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ. Диссертационная работа изложена на 196 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, 6 глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, описание перспектив дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 23 рисунками и 42 таблицами. Список литературы включает 342 источника, в том числе 53 отечественных и 289 – зарубежных.

Во введении автором четко сформулированы актуальность темы диссертационного исследования, степень ее разработанности, цель и задачи исследования, его научная новизна. Корректно определены теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

В разделе «Обзор литературы» освещены современные представления о патогенезе инфекций кровотока и ЦНС грамотрицательной этиологии, роли факторов вирулентности и бактериальных биопленок в инфекционном процессе. Также автор приводит подробный анализ как отечественных, так и зарубежных исследований о наиболее распространенных механизмах устойчивости к карбапенемам и полимиксинам у грамотрицательных бактерий.

В главе 2 («Материал и методы исследования») дана характеристика изученных групп микроорганизмов, критерии включения и невключения в исследование, подробно описаны использованные методы исследования. Приведены методы выделения и идентификации микроорганизмов, определения их чувствительности к антимикробным препаратам (АМП),

определения биопленкообразования. Подробно описаны молекулярно-генетические методы: определение генов резистентности к АМП и вирулентности, типирование микроорганизмов и полногеномное секвенирование.

В главе 3 описан спектр микроорганизмов, выделенных из положительных гемокультур и проб ликвора. Описана существенная роль коагулазонегативных стафилококков, среди грамотрицательных патогенов отмечено преобладание *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Также в этой главе описана чувствительность к АМП у изученных групп. Показано, что изученные грамотрицательные патогены обладали широким спектром устойчивости к АМП разных групп, в том числе к карбапенемам и полимиксидам.

Глава 4 посвящена результатам исследования молекулярно-генетических и фенотипических характеристик *A. baumannii*. Автором показано, что у изолятов *A. baumannii*, выделенных из образцов крови и ликвора у детей, преобладают карбапенемазы молекулярного типа ОХА-40, большая часть штаммов относится к фенотипу МЛУ и формирует биопленки слабой интенсивности. Автором было выявлено, что МПК меропенема для бактерий в составе биопленок значительно превышали МПК для планктонных клеток.

Глава 5 содержит результаты изучения фенотипов резистентности, генов устойчивости к карбапенемам и генов вирулентности *K. pneumoniae*. Автором было показано, что изоляты *K. pneumoniae* обладают большим количеством β -лактамаз и генов вирулентности. Было выявлено, что значительная доля штаммов имеет фенотип ШЛУ и принадлежит к генотипам высокого эпидемического риска ST307 и ST395. Примечательно, что именно у изолятов этих генотипов факторы гипервирулентности были выявлены значительно чаще.

Глава 6 включает результаты изучения штаммов *P. aeruginosa*. Автором было отмечено, что изоляты синегнойной палочки в основном были представлены МЛУ и ШЛУ штаммами, продуцирующими МБЛ VIM. Большая часть штаммов *P. aeruginosa* формировали биопленки высокой интенсивности, при этом в геноме изолятов с высокой интенсивностью формирования биопленок чаще, чем у остальных был выявлен ген биопленкообразования *pilB*. В клональной структуре изолятов *P. aeruginosa* лидировали представители генотипов высокого эпидемического риска ST654, ST235 и их однолокусные варианты.

В главе 7 описаны результаты изучения *S. marcescens*. Было показано, что этот микроорганизм в сравнении с предыдущими имеет более

благоприятный профиль устойчивости. Однако уже можно говорить о его становлении, как возбудителя инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. У *S. marcescens* выявлено большое разнообразие комбинаций β -лактамаз. Было выявлено, что среди изолятов *S. marcescens* преобладали штаммы с умеренной способностью к образованию биопленок. Значительная доля этих штаммов проявляла устойчивость к аминогликозидам и защищенным цефалоспорином. Был успешно применен метод МЛСА для клинических штаммов *S. marcescens*, в ходе которого было выявлено преобладание одной из генотипических групп, в которую входили изоляты с МЛУ и карбапенемазами.

В главе 8 были приведены результаты полногеномного исследования наиболее устойчивых изолятов *K. pneumoniae*, в ходе которого был определен широкий спектр генов β -лактамаз, а также генов устойчивости к другим группам АМП: аминогликозидам, фторхинолонам, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу. Стоит отметить, что у всех штаммов в ходе полногеномного исследования был выявлен ген *PhoP_26Q*, который обуславливает устойчивость к полимиксинам.

В главе «Заключение» автором представлен подробный анализ результатов собственных исследований в сопоставлении с современными данными отечественных и зарубежных авторов.

Выводы обоснованы, конкретны и соответствуют поставленным задачам.

Диссертация хорошо оформлена и содержит всю необходимую информацию о результатах экспериментальных исследований, достоверность которых не вызывает сомнений. Работа содержит незначительное количество опечаток терминологических и стилистических неточностей, не снижающих ее качество.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные положения и выводы диссертационной работы.

Замечания по содержанию и оформлению диссертации

Принципиальных замечаний по оформлению и содержанию диссертационной работы нет. В качестве дискуссионных соискателю предлагаются следующие вопросы:

1. Автор утверждает, что устойчивость к карбапенемам обусловлена выработкой карбапенемаз: *A. baumannii* – OXA-40, *K. pneumoniae* – OXA-48, *P. aeruginosa* – VIM, *S. marcescens* – комбинацией OXA-48 и NDM, при этом исследование проведено на материале, полученном в период с 2014 по 2021 гг. В настоящее время эпидемиологическая ситуация по распространенности и молекулярной структуре карбапенемаз существенно изменилась. Влияет ли это на выводы настоящего исследования, и если да – то как?
2. Известно, что устойчивость грамотрицательных бактерий к карбапенемам обусловлена, помимо продукции карбапенемаз, рядом других механизмов. Какая доля каждого из исследованных патогенов, устойчивых к карбапенемам, не продуцировала карбапенемазы и за счет чего они были устойчивы к карбапенемам?
3. В связи с чем не определялась чувствительность исследованных изолятов к другим карбапенемам, помимо имипенема и меропенема?
4. Для выявления детерминант резистентности к карбапенемам автором рекомендовано использование ПЦР. Какова при этом роль более простых и доступных на практике фенотипических и аналитических методов определения продукции карбапенемаз?

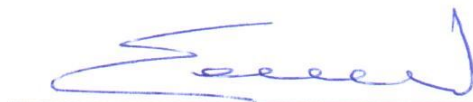
Заключение

Таким образом, диссертационная работа Садеевой Зульфиры Закиевны на тему: «Характеристика грамотрицательных бактерий, выделенных из крови и ликвора у детей», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи по изучению популяционной структуры и молекулярно-генетических предикторов антибиотикорезистентности и вирулентности у грамотрицательных бактерий, выделенных из крови и ликвора у детей, что соответствует требованиям п. 16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», утвержденным приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 г. (с изменениями, утвержденными приказом ректора №1179 от 29.08.2023 г., приказом Сеченовского Университета №0787/Р от 24.05. 2024 г.),

предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Садеева Зульфия Закиевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

Профессор РАН, доктор медицинских наук
(14.01.20. Анестезиология и реаниматология,
03.02.03. Микробиология (1.5.11. Микробиология),
заведующий микробиологической (бактериологической)
лабораторией – врач бактериолог
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр сердечно-сосудистой
хирургии имени А.Н. Бакулева»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
Попов Дмитрий Александрович



Согласен на обработку персональных данных.

Подпись Попова Д.А. заверяю

Начальник отдела кадров
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр сердечно-сосудистой
хирургии имени А.Н. Бакулева»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
М.Е. Сухина



Дата 26.02.2025 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации;
119049, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 8; Тел.: +7(495)414-79-76; e-mail: info@bakulev.ru