ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора,
заведующей лабораторией экспериментальной микробиологии отдела
микробиологии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»

Грубер Ирины Мироновны

на диссертационную работу БРЖОЗОВСКОЙ Екатерины Анатольевны
на тему: «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики
носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной
устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг. », представленную
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по
специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Как известно, несмотря на все усилия, инфекционные заболевания, вызываемые *S. pneumoniae*, продолжают оставаться серьезной угрозой во всем мире, хотя отмечается снижение инвазивных форм, что обусловлено масштабным введением вакцинации.

В последние годы увеличивается доля пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью, она может составлять от 5,6% до 30% популяции. Мониторинг распространения резистентности и расшифровка ее механизмов являются актуальной задачей для выработки мер по нейтрализации угрозы дальнейшего роста устойчивости пневмококков.

Горизонтальный межвидовой и внутривидовой перенос генетических элементов обеспечивает гетерогенность популяции пневмококков, определяет пластичность генома, в том числе приводит к переносу детерминант антибиотикорезистентности. Этому способствует избыточное применение антибиотиков, стимулирующее адаптацию микроорганизмов. По данным ВОЗ в 2017г. *S. pneumoniae*, обладающие фенотипом МЛУ, в том числе устойчивые к антибиотикам группы β -лактамов, а также к макролидам, отнесены к приоритетным микроорганизмам, представляющим угрозу жизни людей. Внедрение ПКВ в национальные программы иммунизации приводит к «замещению серотипов», в том числе не редким является событие переключения капсулы в пневмококковой популяции, приводящее к приобретению невакцинными серотипами капсулы более устойчивых к антибиотикам успешных вакцинных клонов, что подтверждено многочисленными работами. Все это влияет на изменение распространенности серотипов.

Приведенные обстоятельства показывают, что серотипспецифический иммунный ответ, формирующийся на ограниченное число серотипов, входящих в состав современных конъюгированных вакцин, недостаточен для профилактики пневмококковых инфекций, которые относятся к вакциноуправляемым. Это требует определения новых подходов при разработке вакцин, способных выработать серотипнезависимую защиту. Основными типами инновационных вакцин являются разрабатываемые на основе протективных белковых антигенов, в том числе в комплексе с капсульными полисахаридами, с использованием адъювантов или систем доставки антигена, а также инактивированные цельноклеточные препараты и живые аттенуированные вакцины, способные охватывать большинство пневмококковых штаммов.

Предметом данного исследования является выявление и описание фенотипических особенностей выделенных педиатрических изолятов *S. pneumoniae* с МЛУ и изучение их молекулярно-генетических особенностей.

Таким образом, исследование, посвященное изучению профиля антибиотикорезистентности пневмококков и анализу, на основании серо- и генотипирования, механизмов их множественной лекарственной устойчивости, может способствовать прогнозированию появления новых резистентных клонов и является исключительно актуальным и своевременным.

Бржозовская Екатерина Анатольевна проведя анализ данных литературы, учитывая современные методологические возможности и опыт предшествующих исследований, сформулировала четыре задачи, последовательное решение которых позволило получить достоверные данные и сформулировать выводы, характеризующиеся научной новизной.

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

Достоверность научных положений и выводов основывается на большом количестве выполненных исследований, использовании современных лабораторных методов и статистических программ для обработки данных, на широком спектре и характере оцениваемых показателей, соответствующих цели и задачам диссертации, современном методическом уровне. В исследовании использован большой фактический материал: из 2174 изолятов детально изучено 478, имевших МЛУ-фенотип. Серотипирование проводили двумя методами, в том числе осуществляя молекулярное типирование с помощью мультиплексной ПЦР. Определение

генов резистентности к антибиотикам проводили с применением ПЦР, сиквенс-тип устанавливали с помощью метода МЛСТ, проводили высокопроизводительное полногеномное секвенирование. В работе использован комплекс современных микробиологических, молекулярно-генетических методов исследования, сертифицированные реагенты и аттестованное лабораторное оборудование.

Методы статистической обработки, использованные диссертантом при анализе накопленной базы экспериментальных данных, позволили объективно и достоверно оценить полученные результаты и сделать обоснованные выводы.

Таким образом, сформулированная автором цель исследования достигнута решением соответствующих задач, что отражено в выводах, базирующихся на обширном экспериментальном материале. Основные положения, выносимые на защиту, четко сформулированы; обоснованы и логичны, также представляются практические рекомендации диссертационной работы, которые основаны на полученном автором значительном экспериментальном материале и хорошо согласуются с современными научными представлениями в данной области. Содержание представленных материалов свидетельствует о завершенности диссертационной работы. Указанные обстоятельства позволяют считать изложенные в диссертации научные положения, выводы и рекомендации достаточно обоснованными.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 7 работ в журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК; 4 из них - реферируемые базой данных Scopus и Web of Science, две статьи опубликованы в журналах, входящих в первый квартиль (Q1) и одна статья - во второй квартиль (Q2) по импакт-фактору SJR.

Научная новизна исследования

Впервые среди циркулирующих изолятов пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью идентифицированы преобладающие серотипы 19F, 6B, 14, 19A, 23F (84,7% всех МЛЮ изолятов), входящие в состав Prevenar 13. Из «невакцинных» серотипов МЛЮ установлена у пневмококков серотипов 23A, 13, 28F и 11A (6,0% всех МЛЮ изолятов). Показано, что в этой популяции пневмококков при определении минимальной подавляющей концентрации для десяти групп антимикробных препаратов была установлена резистентность к β -лактамам, сочетанная с

устойчивостью к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и триметоприму/сульфаметоксазолу.

Новые данные, полученные при анализе молекулярно-генетической характеристики выделенных штаммов заключаются в следующем:

- показана распространенность основных молекулярных механизмов резистентности пневмококков, включая носительство генов устойчивости к макролидам/линкозамидам, тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу, фторхинолонам (соответственно, *ermB*, *tetM*, *catpQ194*, мутации генов *folA* и *folP*, а также *parC/parE* и *gyrA/gyrB*);

- охарактеризован новый клон пневмококков ST2754 серотипа 13, распространенный в РФ;

- впервые обнаружен пневмококк серотипа 15А ST14599 с МЛУ, возникший в результате переключения локуса полисахаридной капсулы у пневмококка серотипа 19А; охарактеризован его геном и последовательность аннотирована и депонирована в международную базу данных GenBank (регистрационный номер WMIJ01000000).

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая и практическая значимость выполненных автором исследований не вызывает сомнения. Диссертант показал серотиповое разнообразие пневмококков с МЛУ и преобладание среди них серотипов, входящих в состав Prevenar 13, что позволяет прогнозировать положительный вклад вакцинации в преодоление резистентности пневмококков. Определены антибиотики, к которым большинство пневмококков с МЛУ сохраняют чувствительность - это цефтриаксон, цефтаролин, фторхинолоны, ванкомицин, что следует учитывать при выборе терапии инфекций, ассоциированных с резистентными пневмококками. В тоже время исследование молекулярных механизмов МЛУ показало перекрестную резистентность ко всем макролидам, что свидетельствует против применения этой группы препаратов для лечения пневмококковых инфекций.

Полученные экспериментальные данные о появлении и распространении в РФ невакцинного клона ST2754 с МЛУ, а также описание рекомбинантного изолята серотипа 15А - нового сиквенс-типа ST14599, появившегося в результате геномной перестройки локуса полисахаридной капсулы *cps* пневмококка распространенного клона ST276 серотипа 19А, свидетельствуют о динамизме и пластичности пневмококковой популяции и

вносят фундаментальный вклад в понимание закономерностей эволюции пневмококков.

Пополнение международных баз данных новыми генотипами пневмококков будет способствовать дальнейшим исследованиям молекулярной эпидемиологии пневмококков.

Результаты исследований и разработок были внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в обучающие материалы кафедры общей патологии медико-биологического факультета ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Оценка содержания диссертации и ее завершенность

Представленная диссертация построена по традиционному плану, изложена хорошим литературным языком на 120 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 5 глав - обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 3 глав, отражающих результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и описания перспектив дальнейшей разработки темы, списков сокращений и литературы. Работа иллюстрирована 9 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 184 источника: 25 ссылок на работы отечественных и 159 – зарубежных исследователей.

Во **введении** диссертации обоснована актуальность выбранной темы исследования, отражены научная новизна, практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту, сведения об апробации и публикациях. Поставленные задачи соответствуют цели работы и положениям, выносимым на защиту.

В **обзоре литературы** автор компетентно анализирует современное состояние проблемы, останавливаясь на микробиологии пневмококков и патогенезе пневмококковых инфекций, устойчивости пневмококков к противомикробным препаратам, перечисляет известные пневмококковые вакцины и кратко останавливается на перспективах разработки новых пневмококковых вакцин; уделяет внимание известному феномену «переключения» капсулы и замещения серотипов. Проведенный анализ позволил соискателю обосновать направленность исследований в данной работе и ее актуальность.

В **главе «Объекты и методы исследования»**, наряду с описанием известных используемых микробиологических и серологических методов, подробно приведены основные этапы современных методов молекулярных

исследований (ПЦР, МЛСТ, полногеномного секвенирования). Следует отметить высокий уровень методических подходов с применением этих современных методов исследования, что свидетельствует о профессионализме соискателя.

В первой главе собственных исследований (глава 3 в диссертации) приведены результаты анализа распространенности спектра антибиотикорезистентности и серотипового разнообразия пневмококков с МЛУ на основании изучения 2174 изолятов, в основном носоглоточных, выделенных в 2010 - 2017гг. у детей ≤ 5 лет; 478 из них были устойчивы к 3 и более группам антибиотиков и были изучены детально с определением МПК (а также МПК₅₀ и МПК₉₀) к 10 группам антибиотиков и относились к 24 серотипам. В структуре МЛУ-пневмококков преобладали ПКВ13-серотипы (89,3%), а среди них - серотипы 19F, 6B, 14, 19A, 23F (84,7% всех МЛУ изолятов). Из «невакцинных» серотипов МЛУ установлена у пневмококков серотипов 23A, 13, 28F и 11A (6,0% всех МЛУ изолятов). Уместно отметить, что динамическое наблюдение показало в 2017г. (через 3 года после введения в России вакцинации, в частности Prevenar 13), снижение общего числа МЛУ-изолятов, с 36,7% до 27,1%, нараставшее до 2016 г., при тенденции к снижению МЛУ с 93% до 86% среди «вакцинных» серотипов. Это, как отмечает диссертант, позволяет прогнозировать положительный вклад вакцинации в преодоление резистентности пневмококков, что важно и требует подтверждения при последующих динамических исследованиях.

В структуре серотипов 14, 19A, 19F и 23F более 45% изолятов характеризовались экстремальной лекарственной устойчивостью - резистентностью к 5 и более группам антибиотиков (β -лактамам, эритромицину, клиндамицину, триметоприму/сульфаметоксазолу, тетрациклину, хлорамфениколу и фторхинолонам).

Проведенное изучение основных молекулярных механизмов резистентности пневмококков показало распространенность носительства генов устойчивости к макролидам/линкозамидам, тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу, фторхинолонам (соответственно, *ermB tetM, catpQ194*, мутации генов *folA* и *folP*, а также *parC/parE* и *gyrA/gyrB*).

Вторая глава (глава 4 в диссертации) посвящена изучению с помощью МЛСТ 16 генотипов 24 не-ПКВ13 серотипов пневмококков с МЛУ, в результате чего было выявлено 23 сиквенс-типа, пять из которых (14416, 14599, 14692, 14693 и 14694) были описаны впервые. Большинство генотипов с фенотипом МЛУ характеризовалось устойчивостью к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и/или триметоприму/сульфаметоксазолу.

Отсутствие типичной связи генотип-серотип отмечено у распространенного в выборке ST2754, носителем которого были изоляты серотипов 13 и 9N. При построении филогенетического дерева ST2754-изоляты образовывали два кластера. Сравнение последовательности *core*-геномов ST2754 разных серотипов (при многократном выравнивании последовательностей проводили сравнение с эталонным изолятом *S. pneumoniae* R6) показало идентичность *cps*-локусов и генов фланкирующих областей изолятов внутри каждого кластера. На основании полной идентичности последовательностями генов (*pbp1a* и *pbp2x*) изолятов серотипов 9N и 33B, диссертант предполагает переключения серотипа путем приобретения изолятом с генотипом ST2754/33B капсулы 9N. Показано, что в последние годы в РФ получил распространение клон ST2754 редкого серотипа 13 с МЛУ. В работе подчеркивается, что этот клон МЛУ, имеющий дополнительные детерминанты вирулентности (систему метаболизма аргинина, повышающую способность к адгезии и инвазии, и locus бактериоцинов), предположительно обладает потенциалом для закрепления в популяции, что требует дальнейшего отслеживания.

В третьей главе (глава 5 в диссертации) приведены данные, свидетельствующие о возникновении пневмококка серотипа 15А с МЛУ, относящегося к новому ST14599, в результате переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19А. При использовании полногеномного секвенирования проведен филогенетический анализ изолятов пневмококка, потенциальных реципиентов и доноров *cps*-локуса и затем после многократного выравнивания последовательностей геномов их сравнивали у рекомбинанта-15А/ST14599 (*Sp1994*) с геномами реципиента-19А/ST276 и донора-15А/ST861. Установлено, что рекомбинант и донор содержали один и тот же паттерн 3'-транспозазного гена (*tnp*), но в отличие от донора, рекомбинант обладал двумя небольшими делециями. Кроме того, определены последовательности генов, идентичные у рекомбинанта и донора. На этом основании диссертант предполагает, что переключение *cps*-локуса произошло посредством гомологичной рекомбинации фрагмента *cps*-локуса размером 15 kb между пневмококком серотипа 15А в качестве донора и пневмококком 19А/ST276 в качестве реципиента.

Представляется важной находка общих нуклеотидных вариаций в генах, с одной стороны, связанных с устойчивостью к β -лактамам и вирулентностью у рекомбинанта и реципиента, и с другой стороны наличие у рекомбинанта и донора большого участка ДНК, содержавшего гены дополнительной секреторной системы, встроенной в островок патогенности,

причем этот локус отсутствовал в геноме реципиента, что, как предполагает диссертант, может указывать, что переключение капсулы, не являющееся редким событием для пневмококков, произошло давно и не под давлением вакцинации.

В заключении обсуждаются результаты собственных исследований в сравнении с известными литературными данными и подчеркивается, что динамически изменяющаяся пневмококковая популяция и появление рекомбинантных генетических линий с МЛУ-фенотипом требуют постоянного эпидемиологического надзора для выработки стратегии своевременного ответа.

Достоверными, экспериментально обоснованными являются выводы, соответствующие цели и задачам исследования. Представленные практические рекомендации обоснованы полученными результатами. Указаны перспективы дальнейшей разработки темы.

В список используемых сокращений введены общепринятые, часто используемые автором аббревиатуры.

Автореферат в полной мере отражает основное содержание диссертации и соответствует ГОСТ 7.0.11-2011.

В процессе рассмотрения диссертационной работы, выполненной на высоком научно-методическом уровне, были выявлены незначительные опечатки, стилистические неудачи и досадные технические погрешности (стр. 8, 36, 55, 81); недостаточная информативность обозначений на рис.4.2 устранена в автореферате на рис.2В. В таблице 3.3 (стр.55) непонятен смысл показателя – накопленный процент, поскольку он представляет последовательное увеличение суммы величин предыдущей графы, в которой они суммируются в конце. Существенных замечаний нет, а приведенные мелкие замечания не снижают высокую общую оценку работы.

Диссертационная работа представляет собой самостоятельное законченное научное исследование. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – «микробиология», области исследований «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».

Заключение

Диссертационная работа Бржозовской Екатерины Анатольевны на тему «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.», выполненной при