

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи
(ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

академик РАН, д.м.н., профессор,

Д.Б. Никитюк

« 08 » апреля 2025 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Андриянова Павла Алексеевича на тему «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов эмерджентных сапронозных бактерий *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, обладающих фенотипом множественной лекарственной устойчивости», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. - Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационной работы и её связь с планами соответствующих отраслей науки

В современных условиях глобализации, изменения климата и интенсификации сельскохозяйственного производства эмерджентные инфекционные заболевания становятся одной из ключевых проблем общественного здравоохранения.

Формирование новых представлений о свойствах патогенных микроорганизмов базируется на углубленном анализе механизмов и путей передачи возбудителей, их патогенного потенциала, с учетом непрерывной трансформации внешней среды, популяционного иммунитета и предрасположенности различных групп населения к инфекционным заболеваниям. Большое значение в механизмах эволюции и сохранения жизнеспособности у бактерий играют не только факторы генетической регуляции экспрессии патогенности, но и развитие стратегий уклонения от физиологических барьеров и

иммунной системы в макроорганизме или от неблагоприятных воздействий в экологических резервуарах возбудителя во внешней среде.

На современном этапе одной из особенностей эпидемиологии инфекционных заболеваний является усиление роли оппортунистических инфекций, наибольшей чувствительностью к которым обладают уязвимые группы населения (дети, старики, больные хроническими заболеваниями, лица с иммунодефицитом). Ухудшение здоровья человеческой популяции рассматривается, как один из приоритетных факторов, обуславливающих усиление воздействия на организм эмерджентных патогенов, что обосновывает необходимость разработки новых подходов для борьбы с этими инфекциями.

Особое место среди них занимают сапронозные инфекции, поскольку наряду с зоонозными агентами, не менее значимым резервуаром оппортунистических патогенов сегодня признаётся окружающая среда. В ней под влиянием разнообразных триггеров, в том числе поллютантов техногенного происхождения, таких, как остатки антибиотиков, биоцидов, токсичных элементов и др., происходит накопление трансформированных представителей водных, почвенных, растительных микробиоценозов, способных приобретать вирулентные свойства и вызывать те или иные формы патологий.

Доказана роль водных и растительных экосистем как банка для накопления и сохранения большого числа природных популяций потенциально патогенных бактерий, метаболическая пластичность и генетическая неоднородность которых позволяет менять среду обитания и вегетировать в организме человека или животных, в воде и пищевых продуктах, сохраняя при этом свой патогенный потенциал. Во многом у бактериальных патогенов это реализуется из-за наличия детерминированных механизмов резистентности к антимикробным и другим стрессовым воздействиям.

Микробное многообразие природных экосистем обуславливает вариабельность видового состава бактериальных популяций, доминирующих в тех или иных резервуарах растительного, почвенного, водного происхождения. Все чаще в качестве этиологических агентов новых и вновь возникающих инфекций квалифицируются представители сапронозных грамотрицательных бактерий из семейств *Pseudomonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, малоизученных таксонов *Enterobacteriaceae* spp., которые также привлекают внимание и в качестве модельных организмов для изучения экологических особенностей и эволюции природных микробных сообществ.

В этом аспекте безусловно актуальными объектами научных исследований являются малоизученные грамотрицательные бактерии *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, которые в последнее время все чаще становятся этиологическими агентами тяжелых эмерджентных инфекций с высокой летальностью, характеризуясь природной

устойчивостью к широкому спектру антибактериальных препаратов. Важно, что при этом они рассматриваются в качестве потенциальных контаминантов пищевой продукции. Недостаток информации о механизмах патогенности этих видов, факторах вирулентности и путях передачи создает значительные пробелы в понимании их роли в развитии инфекционных заболеваний.

Особенный интерес вызывает изучение их распространения через пищевые продукты животного происхождения, в частности, через сырое коровье молоко, которое может быть загрязнено широким спектром грамотрицательных бактерий, включая представителей эпидемиологически значимых возбудителей сапрозоонозов *Yersinia*, *Leptospira*, *Pseudomonas* spp. Пищевой путь передачи *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* в настоящее время не доказан, однако с учётом косвенных признаков, подтверждающих вероятность расширения способов передачи возбудителя, весьма важна оценка их роли в пероральном механизме заражения.

Принципиально важной задачей является и оценка диагностической значимости существующих тестов идентификации для выявления эмерджентных *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, и их дифференциации от фенотипически близких вариантов грамотрицательных неферментирующих бактерий.

Очевидна также необходимость использования современных методов генетического анализа штаммов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, как для целей высоко специфического таксономического анализа, так и для исследования биологических свойств обоих возбудителей (антибиотикорезистентности и патогенности), поскольку их результаты будут иметь определяющее значение для разработки эффективных стратегий диагностики, лечения и профилактики инфекций, вызываемых этими бактериями.

Таким образом, представляется необходимым проведение исследований для выяснения природных источников распространения *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, а также кодируемых факторов их вирулентности и патогенности. Это позволит сформировать представления о циркуляции отдельных штаммов и структуре популяций возбудителей, будет способствовать созданию новых диагностических систем для быстрой идентификации. Диссертационная работа Андриянова П.А. особенно актуальна в контексте растущей устойчивости возбудителей к антибиотикам, которая представляет собой одну из наиболее серьезных угроз для здоровья населения в XXI веке.

Диссертационная работа Андриянова П.А. выполнена в основном русле научных исследований Нижегородского научно-исследовательского ветеринарного института – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ). Эти работы включают получение развернутых характеристик штаммов возбудителей III-IV групп

патогенности из «Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» на базе ФГБНУ ФИЦВиМ и изучение эмерджентных патогенных бактерий, относящихся к группе возбудителей сапронозов. Данная деятельность направлена на установление спектра известных и новых возбудителей, в том числе, характеризующихся множественной устойчивостью к антибиотикам, которые представляют потенциальную опасность для здоровья населения России, а также могут нанести ущерб народному хозяйству.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

При исследованиях характера микробной контаминации сырого молока впервые показано присутствие в молочном сырье представителей эмерджентных сапронозных бактерий видов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*. Штамм *E. anophelis* на территории России выявлен и охарактеризован впервые, что расширяет представления о географическом распространении данного эмерджентного патогена.

Андряновым П.А. с использованием современных высоко воспроизводимых молекулярных методов проведен сравнительный геномный анализ выделенных из сырого молока штаммов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, позволивший идентифицировать уникальные гены, связанные с их вирулентностью и устойчивостью к антибиотикам. В геноме обоих штаммов были обнаружены системы эффлюкса и гены бета-лактамаз, которые определяют фенотип множественной лекарственной устойчивости. При этом показано, что многие факторы устойчивости локализованы на хромосоме и входят в коровый геном данных видов. Установлена четкая взаимосвязь между наличием данных генетических детерминант и фенотипической устойчивостью микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Выявление этих патогенов в сыром коровьем молоке указывает на потенциальные риски их передачи через пищевую цепь. Это имеет большое значение для общественного здравоохранения, так как расширяет понимание путей распространения инфекций и подчеркивает необходимость усовершенствования технологических приёмов первичной переработки и мер контроля безопасности продовольственного сырья.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Диссертационная работа Андрянова П.А. по изучению штаммов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* имеет как теоретическую, так и практическую значимость.

Полученные новые данные о микробной контаминации сырого молока свидетельствуют о потенциальных рисках выживания и размножения в нем сапронозных патогенов с эволюционно измененными биологическими свойствами,

полифункциональными механизмами адаптации и патогенным потенциалом: результаты микробиологического скрининга показали присутствие в сыром коровьем молоке эмерджентных бактерий *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* с частотой 1,4% сл. (по 1 изоляту каждого вида из 72 исследованных проб). Это указывает на реальную возможность попадания малоизученных возбудителей в пищевую цепь и имеет важнейшее значение для оценки и прогнозирования рисков в сфере микробиологической безопасности пищи, в первую очередь для разработки, внедрения и поддержания процедур, основанных на принципах ХАССП, при осуществлении процессов производства пищевой продукции, связанных с необходимостью обеспечения такой продукции требованиям безопасности.

Научно-практическая значимость работы Андриянова П.А. обусловлена возможностью разработки эффективных стратегий диагностики и лечения заболеваний, вызываемых возбудителями оппортунистических инфекций *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, что особенно важно в условиях растущей устойчивости микроорганизмов к существующим препаратам. Знание профилей их чувствительности к антибиотикам поможет подбирать более эффективные схемы терапии, что снизит риск осложнений и сократит время выздоровления пациентов.

Личный вклад автора

Согласно информации, представленной Андрияновым П.А., в тексте диссертации и автореферате, личный вклад автора заключается в самостоятельном выполнении ключевых этапов диссертационного исследования, включая анализ научной литературы и написание обзора, выделение чистых культур *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, их идентификацию и описание культурально-морфологических характеристик. Автор сам провел молекулярно-биологические исследования и выполнил биоинформатический анализ полученных данных. Секвенирование ампликонов генов 16S рРНК методом Сэнгера, а также полногеномное секвенирование штаммов на платформе Illumina выполнены сторонними организациями. Интерпретация результатов секвенирования и их анализ осуществлены автором лично.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты и выводы диссертационной работы Андриянова П.А. могут быть востребованы в научно-исследовательских организациях, выполняющих фундаментальные исследования в сфере изучения экологии новых возбудителей эмерджентных инфекций и совершенствования их лабораторной микробиологической диагностики, а также при разработке рекомендаций по оптимизации антибактериальной терапии с учетом выявленного автором консервативного профиля устойчивости к антибиотикам *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*. Полученные данные о генетических детерминантах вирулентности и

антимикробной резистентности могут быть применены и масштабированы в научных исследованиях по изучению механизмов патогенности и разработке новых методов лечения. Результаты работы могут быть транслированы в научно-практическую деятельность в сфере создания диагностикумов и методов микробиологического контроля пищевых продуктов, что будет способствовать улучшению контроля безопасности пищи и снижению риска возникновения обусловленных данными возбудителями инфекций. Результаты работы также могут быть внедрены в учебный процесс медицинских и биологических вузов для углубления знаний о малоизученных патогенах.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Данная диссертационная работа соответствует следующим пунктам паспорта научной специальности 1.5.11 «Микробиология»: 1, 3, 5, 8, 11, 12, 20 (1. Систематика и филогения микроорганизмов; 3. Биологическое разнообразие микроорганизмов, включая разнообразие типов энергетического обмена и источников углерода; 5. Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов; 8. Микробная экология и биогеохимия; 11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ; 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности; 20. Санитарная микробиология).

Соответствие диссертации научному направлению

Диссертационная работа полностью соответствует научному направлению, утвержденному в рамках специальности, и посвящена актуальной проблеме изучения эмерджентных бактериальных патогенов, представляющих угрозу для общественного здоровья. Исследование охватывает ключевые аспекты микробиологии, включая выявление, идентификацию и характеристику микроорганизмов, а также анализ их роли в развитии инфекционных заболеваний. Полученные результаты органично дополняют современные научные представления о механизмах патогенности и множественной устойчивости к антибиотикам у бактерий, что подтверждает их соответствие современному уровню развития науки. Работа выполнена с использованием современных методических подходов, что обеспечивает ее научную обоснованность и практическую значимость.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов исследования обеспечена использованием современных методов микробиологического, молекулярно-генетического и биоинформатического анализа, которые широко применяются в научной практике и имеют высокую степень точности. Полученные данные подтверждены сопоставлением с литературными источниками, а также повторяемостью экспериментальных результатов на всех этапах работы. Апробация

результатов исследования проведена путем представления их на российских и международных научных конференциях.

Структура и основное содержание работы

Диссертационная работа Андриянова П.А. построена по традиционной схеме и состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, который включает 205 источников, из них 6 отечественных и 199 – зарубежных. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 14 рисунков.

Во «Введении» автор раскрывает актуальность выбранной темы исследования, степень разработанности темы, формулирует цели и задачи диссертационной работы, а также приводит ключевые характеристики работы, включающие её научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов.

Целью исследования являлось получение микробиологической и молекулярно-генетической характеристик штаммов эмерджентных возбудителей сапронозных инфекций *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, выделенных из сырого молока.

При этом были поставлены задачи - выделить чистые культуры бактерий из сырого коровьего молока, идентифицировать изоляты методом определения последовательности гена 16S рРНК, сформировать рабочую панель микроорганизмов, относящихся к возбудителям эмерджентных инфекций; охарактеризовать штаммы классическими микробиологическими методами; определить профиль чувствительности штаммов к антибиотикам; провести полногеномное секвенирование и аннотацию полученной сборки; провести филогенетический анализ изучаемых штаммов; провести сравнительный геномный анализ факторов устойчивости к антибиотикам и факторов вирулентности исследуемых штаммов, используя общедоступные геномы ранее описанных штаммов данных видов.

Первая глава, посвященная обзору литературы, представляет собой детальный анализ современного состояния проблемы. Обзор состоит из трех подразделов. В нем анализируются факторы, способствующие возникновению новых инфекций, приведено описание объектов исследования — бактерий *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* с подробной характеристикой их морфологических, физиологических и патогенных свойств, а также атрибутов устойчивости к антибиотикам.

Раздел «Материалы и методы» детально описывает применяемые в работе методы исследования, включая микробиологические, биохимические, иммунохимические, молекулярно-генетические (выделение бактериальной ДНК, получение библиотек

комплементарной ДНК (кДНК) генов рибосомальной 16S-РНК изолятов, их геномное секвенирование), биоинформатический анализ таксономического разнообразия, методы статистической обработки данных. Методология исследования основана на полифазном подходе, объединяющем классические микробиологические методы и современные биоинформатические технологии. Совокупность выбранных методов полностью соответствует задачам исследования. На основании материала данного раздела можно заключить, что экспериментальная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных аналитических и биоинформатических методов.

В разделе «Результаты собственных исследований» представлены основные результаты работы, сгруппированные в соответствии с поставленными задачами. В разделе дана подробная характеристика пула бактерий, выделенных из образцов сырого молока, показано таксономическое разнообразие изолятов, приведены результаты оценки чувствительности к 33-м (*E. anophelis*) и 23-м (*D. tsuruhatensis*) противомикробным препаратам (бета-лактамам, аминогликозидам, хинолонам, тетрациклинам и др.), сформирована рабочая панель штаммов с акцентом на два ключевых объекта дальнейшего исследования — *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*. Проведен анализ генетических детерминант, связанных с вирулентностью и устойчивостью к антибиотикам, а также их возможной ассоциации с мобильными генетическими элементами. Представлены результаты филогенетического анализа, показавшего высокое сходство выделенного пищевого штамма *E. anophelis* с описанными в литературе клиническими изолятами, что может отражать вероятность передачи данного микроба от животных человеку.

В разделе «Обсуждение результатов» проводится интерпретация полученных результатов, их сравнение с имеющимися в научной литературе данными публикаций на сходные темы, высказаны обоснованные собственными и литературными данными гипотезы о том, что сырое молоко может быть источником штаммов *E. anophelis*, обладающих набором факторов вирулентности и устойчивостью к широко используемым противомикробным препаратам. Обсуждается двойственная роль *D. tsuruhatensis* как потенциального биотехнологического продуцента (для целей очистки промышленных сточных вод, загрязненных терефталатами) и нового условно-патогенного микроорганизма с естественной устойчивостью к противомикробным препаратам.

Обосновано, что необходимо расширение мониторинга различных источников, а также дальнейшие исследования штаммов, выделенных из них, для более глубокого изучения биологии данного патогена. Обсуждаются механизмы патогенности и устойчивости штаммов, а также их другие характеристики и особенности.

В «Заключении» подводятся итоги работы, обобщаются основные результаты и подчеркивается их значимость для понимания свойств изучаемых микроорганизмов. Полученные данные создают прочную основу для дальнейших исследований и имеют важное значение для разработки стратегий диагностики, лечения и профилактики инфекций, вызываемых этими патогенами.

По результатам исследования Андриянова П.А. сформулированы 5 положений, выносимых на защиту, и 5 выводов. Выводы диссертации логично вытекают из проделанной работы, в целом соответствуют поставленным во «Введении» задачам исследования и необходимым образом отражают полученные результаты. Положения, выносимые на защиту, в достаточной степени характеризуют авторскую научную позицию по существу проделанных исследований.

Оценка публикаций по теме исследования

По теме диссертации Андриянова П.А. опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 научных статьи в рецензируемых научных изданиях (Scopus/WoS), рекомендованных ВАК, а также 3 тезиса в сборниках конференций с международным участием. Тематика всех включенных в список публикаций соответствует теме диссертационного исследования. Профиль журналов, в которых представлены публикации, соответствует специальности «Микробиология».

Автореферат диссертационной работы Андриянова П.А. содержит все необходимые разделы, и в полной мере отражает суть проведённого автором исследования.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы Андриянова П.А., сути полученных результатов, новизне, научно-теоретической и научно-практической значимости - не имеется.

В порядке дискуссии хотелось бы отметить, что в разделе, описывающем результаты изучения микробной контаминации сырого молока, было бы целесообразно дать сведения не только о численности культур всех выявленных видов, но и о частоте обнаружения целевых и сопутствующих им видов бактерий по отношению к выборке образцов молока и количестве их КОЕ в 1 г(мл) продукта. Это позволило бы лучше оценить уровни загрязнения молочного сырья новыми патогенами и представить возможные масштабы риска (притом, что методика посева, включающая приготовление нескольких десятичных разведений проб, позволяет сделать такую оценку).

Есть замечания по оформлению работы, в частности по разделам «Задачи исследования» и «Выводы».

Автором сформулировано шесть задач для решения поставленной в диссертации цели. Но ни в одной из них не идёт речь о целевых искомых патогенах *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, и все задачи понимаются, как направленные на «изучение штаммов рабочей панели микроорганизмов, относящихся к возбудителям эмерджентных инфекций» вообще.

При этом выводов приведено пять. В целом они корректно отражают результаты достижения цели, но не всегда совпадают с контекстом задач. Это отмечено в выводах 1, 2, 3, 4. Вывод 2 по сути таковым не является, а относится к предмету новизны исследования. В выводе 5 постулируется гипотеза о накоплении сапронозными бактериями детерминант устойчивости к антибиотикам, как следствии загрязнения антибиотиками окружающей среды. Однако механизмы такого влияния и процессы формирования резистентности у агентов сапронозов не являлись предметом данного исследования.

Имеются отдельные недочеты стилистического и редакционного характера. Например, это такие фразы, как «Тетрациклины являются важнейшими антибиотиками для гуманной и медицины», «... поиск гомологов различных факторов», а также лишние предлоги и союзы по тексту (п. 2.2.1 автореферата), использование пятизначной индексации в разделе результатов исследований.

Указанные замечания не относятся к сути проделанных Андрияновым П.А. исследований и не снижают высокую оценку работы в целом.

Заключение

Диссертационная работа Андриянова П.А. на тему «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов эмерджентных сапронозных бактерий *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, обладающих фенотипом множественной лекарственной устойчивости», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема, связанная с недостаточной изученностью эмерджентных бактериальных патогенов-возбудителей сапронозных инфекций человека и некоторых животных, что имеет важное социально-экономическое и хозяйственное значение для системы здравоохранения и обеспечения биобезопасности пищевой продукции. Результаты исследования создают основу для совершенствования методов диагностики, лечения и профилактики инфекций, вызываемых данными микроорганизмами, что особенно актуально в условиях растущей устойчивости к антибиотикам.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Андриянова Павла Андреевича на тему «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов эмерджентных сапронозных бактерий *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, обладающих фенотипом множественной лекарственной устойчивости» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), а её автор Андриянов Павел Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является её сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с её сотрудниками.

Отзыв на диссертационную работу обсужден и одобрен на научной конференции ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» протокол № 04/11-25 от «08» апреля 2025 г.

Отзыв подготовил:

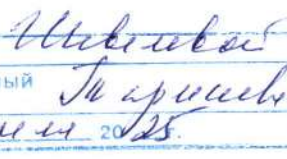
Доктор медицинских наук,
заведующий лабораторией
биобезопасности и анализа
нутримикробиома
ФГБУН «ФИЦ питания и
биотехнологии»



Шевелева Светлана
Анатольевна

Дата: «08» апреля 2025 г.

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ: ученый
секретарь



"08" апреля 2025



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), 109240, г. Москва, Устьинский проезд д.2/14.

Тел. +7 (495) 698-53-60; +7 (495) 698-53-71; Факс +7 (495) 698-53-79; E-mail sheveleva@ion.ru, mailbox@ion.ru; сайт <http://ion.ru>