

Отзыв

официального оппонента

доктора биологических наук Гостева Владимира Валерьевича
на диссертацию 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 на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Актуальность темы исследования

Новые и ранее известные инфекционные болезни, которые в последнее время стали значительно чаще встречаться или начали охватывать новые территории, относятся к категории эмерджентных инфекционных заболеваний. На фоне глобализации и климатических изменений наблюдается тенденция к увеличению числа новых и возвращающихся инфекций. Это подчеркивает необходимость изучения данного явления. Кроме вирусов, опасность представляют также эмерджентные бактериальные инфекции. Диссертация Андриянова П.А. посвящена изучению двух штаммов эмерджентных бактериальных агентов, выделенных из сырого коровьего молока: *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*. В последнее время бактерии *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* все чаще становятся причиной серьезных инфекций по всему миру. Отмечаются отдельные случаи и вспышки заболеваний. Однако биологические свойства этих патогенов все еще недостаточно исследованы.

Бактерии вида *E. anophelis*, ранее относящиеся к роду *Chryseobacterium*, первоначально были выделены и описаны у насекомых в 2011 г. (Kämpfer et al., 2011), а к настоящему времени рассматриваются как серьезные возбудители внутрибольничных инфекций. По результатам различных наблюдений и описанию клинических случаев, вид *E. anophelis* является наиболее частым возбудителем инфекций человека среди представителей *Elizabethkingia*. Преимущественно инфекции регистрируются у новорождённых, пожилых пациентов, а также пациентов с различными иммунодефицитами, при этом нередко *E. anophelis* выделяется при бактериемиях и менингитах (Janda et al., 2017). Смертность может достигать до 45% (Nielsen et al., 2018; Vessely et al., 2024). В литературе детально описаны две вспышки, вызванные *E. anophelis*. Первая вспышка была документирована в 2012 г. в Сингапуре в

отделении ОРИТ у пяти пациентов (Teo, et al., 2013), вторая – в 2015 г., охватившая несколько городов на территории США (Perrin et al., 2016). Стоит отметить, что уровень летальности составлял 30%. Данные наблюдения подчеркивают особую клиническую значимость выделения *E. anophelis*. Немаловажным аспектом является и широкая природная устойчивость *E. anophelis* к действию антимикробных препаратов, что является лимитирующим фактором антибактериальной терапии таких инфекций. Так, по имеющимся данным, *E. anophelis* проявляет устойчивость к цефалоспорином, аминогликозидам, карбапенемам, полимиксином (Chew et al., 2018; Burnard et al., 2020). Наиболее эффективные антибиотики – это миноциклин, доксициклин, рифампицин, и триметоприм-сульфаметоксазол (Vessely et al., 2024). Однако стоит отметить, что в настоящее время отсутствуют убедительные исследования как *in vitro*, так и *in vivo* с моделированием PK/PD в отношении эффективности этих антибиотиков для лечения инфекций, вызванных *E. anophelis*. Наряду с этим, остаются до конца не изученными такие аспекты как: особенности молекулярной эпидемиологии и формирование эпидемических клонов, факторы вирулентности *E. anophelis*, и их взаимосвязь с разными генетическими линиями.

Другой представитель сапронозных микроорганизмов, который рассматривается в диссертации – *D. tsuruhatensis* (ранее относился к роду *Comamonas*), впервые выделенный в Японии из активного ила и описанный в 2003 г. (Shigematsu et al., 2003). Несмотря на то, что *D. tsuruhatensis* обитает в природных экосистемах и входит в состав микробиоты человека, данный микроорганизм способен вызывать тяжелые инфекции у человека (Preiswerk et al., 2011; Ranc et al., 2018). *D. tsuruhatensis* характеризуется природной устойчивостью к аминогликозидам, а также в некоторых работах отмечается множественная устойчивость к другим антимикробным препаратам. Более того, подчеркивается успешное распространение мобильных генетических элементов среди *D. tsuruhatensis*, например, в работе Cho et al., (2021) у клинических изолятов описан транспозон Tn402-like, несущий карбапенемазу *bla_{IMP-1}*.

Перечисленные факты подчеркивают необходимость более глубокого изучения эмерджентных микроорганизмов для разработки новых стратегий диагностики и лечения, а также для более эффективных методов контроля их распространения. Исследования в этой области имеют важное значение, как для практического здравоохранения, так и эпидемиологии для предотвращения потенциальных вспышек инфекционных заболеваний.

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

В диссертационном исследовании Андриянова П.А. были сформулированы научные положения и выводы, основанные на результатах экспериментальных данных. Эти данные были получены с использованием нескольких подходов. Автор использовал как классические микробиологические методы для описания фенотипов, так и молекулярно-генетические для изучения генотипических особенностей. Таким образом, были выявлены фенотипы множественной лекарственной устойчивости у изучаемых штаммов, определены генетические детерминанты, ответственные за формирование резистентности. Появление микроорганизмов с широкой природной устойчивостью к антимикробным препаратам в качестве новых инфекционных агентов отражает тенденцию к селекции таких фенотипов в условиях массового применения антибиотиков, не только в клинической практике, но и в животноводстве и сельском хозяйстве. Очевидно, что исследование диссертанта подчеркивает важность и необходимость проведения дальнейших исследований в рамках концепции «One health».

В ходе исследования геномов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* был обнаружен широкий спектр гомологов факторов вирулентности. Эти факторы являются стабильными в различных филогенетических группах изучаемых штаммов. Основываясь на результатах своих исследований и анализе доступной литературы, автор доказывает, что изучаемые виды бактерий являются новыми возбудителями сапронозов. Подчеркивается их способность к широкому распространению, способность вызывать инфекции у различных видов животных.

Таким образом, научные положения и выводы в данной диссертационной работе основаны как на анализе литературных данных, так и на результатах экспериментальных исследований, проведенных автором. Объем проведенной работы соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Научная новизна исследования

В работе впервые был описан и охарактеризован штамм *E. anophelis*, выделенный из сырого коровьего молока на территории России. Также в ходе исследования был выделен штамм *D. tsuruhatensis*, который редко встречается в продуктах питания. Выделение этих микроорганизмов из сырого коровьего молока имеет большое значение для общественного здравоохранения. Это не только расширяет знания о путях передачи инфекции, но и указывает на потенциальные риски, связанные

с употреблением непастеризованного молока. Понимание механизмов передачи инфекции необходимо для разработки эффективных стратегий профилактики и контроля, особенно в условиях растущей устойчивости к антибиотикам.

В ходе сравнительного филогенетического анализа выделенных штаммов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis* был выявлен ряд генов, которые кодируют гомологи известных факторов вирулентности. Эти гены включают в себя характерные для грамотрицательных бактерий факторы вирулентности, такие как гены, отвечающие за синтез липополисахаридов, капсулы, формирование пилей IV типа и другие. Кроме того, в геноме обоих штаммов были обнаружены многочисленные гены, которые отвечают за устойчивость к противомикробным препаратам. Среди них можно выделить системы эффлюкса и гены бета-лактамаз, которые существенно влияют на проявление фенотипа множественной лекарственной устойчивости. Наличие этих генов у штаммов согласуется с их фенотипом чувствительности.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Изучение штаммов *E. anophelis* и *Delftia tsuruhatensis* имеет как теоретическую, так и практическую ценность. С научной точки зрения, полученные результаты способствуют более глубокому пониманию механизмов патогенности, расширяют знания о распространении множественной лекарственной устойчивости и создают основу для дальнейших исследований в области микробиологии и медицины.

С практической точки зрения, полученные данные о микробиологических характеристиках и профилях чувствительности этих патогенов могут улучшить диагностику инфекций и оптимизировать применение антибиотиков, что особенно важно в условиях растущей устойчивости к антибиотикам. Кроме того, эти знания могут помочь разработать эффективные стратегии контроля инфекций и сформулировать клинические рекомендации, что будет способствовать снижению заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертационная работа Андриянова П.А соответствует следующим пунктам паспорта научной специальности 1.5.11 «Микробиология»: 1. Систематика и филогения микроорганизмов; 3. Биологическое разнообразие микроорганизмов, включая разнообразие типов энергетического обмена и источников углерода; 8. Микробная экология и биогеохимия; 11. Геномный и метабеномный анализ микроорганизмов и их сообществ; 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности; 20. Санитарная микробиология.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По результатам исследования были опубликованы три статьи в рецензируемых журналах Scopus/WoS, что удовлетворяет требованию ВАК к кандидатским диссертационным работам. Также были опубликованы результаты в материалах нескольких конференций с международным участием (тезисы).

Структура и содержание диссертации

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с классической структурой и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, методология исследования, результаты исследования, обсуждение результатов и выводы. Список использованных источников насчитывает 205 наименований. Общий объём работы составляет 143 страницы, включая 14 рисунков и 8 таблиц.

Во введении диссертации обоснована актуальность исследования, определены его цели и задачи. Описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Указаны основные положения, которые будут представлены на защите, а также информация о публикациях автора по теме диссертации и его личном вкладе в исследование.

В первой главе «Обзор литературы» представлен подробный теоретический анализ проблемы, рассматриваемой в рамках диссертационного исследования. Обзор состоит из нескольких разделов и опирается на актуальные данные. В диссертации подробно описаны объекты исследования — бактерии *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*. Описание структурировано и выполнено в соответствии с традиционными принципами микробиологии, что помогает лучше понять морфологические и физиологические характеристики этих микроорганизмов, а также известные факторы устойчивости и патогенности. Важным элементом данного раздела являются клинические случаи инфекций, ассоциированные с этими бактериями. Описанные примеры реальных случаев заболевания помогает проиллюстрировать патогенные свойства *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, подчеркивая их клиническое значение.

Во второй главе представлены сведения о методиках, которые были использованы в исследовании: микробиологические, молекулярные, полногеномное секвенирование, биоинформатический анализ.

В третьей главе представлено описание результатов проведённой работы. В этом разделе автор представляет разнообразие видов бактерий, которые были выделены из сырого молока. Для этого были использованы методы посева на питательную среду как

с добавлением антибиотиков, так и без них. Затем подробно описываются результаты исследования двух штаммов — *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*. Основной акцент сделан на полногеномном анализе, а также сравнительной геномике.

В главе «Обсуждение результатов» представлен всесторонний анализ данных о фенотипических и генотипических характеристиках штаммов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*, полученных в ходе исследования. В этой части работы проводится сравнение полученных результатов с актуальными данными, представленными в научной литературе, что позволяет выявить сходства и различия с ранее проведенными исследованиями. Рассматриваются факторы, влияющие на вирулентность и устойчивость к антибиотикам, а также подчеркивается значимость полученных данных для дальнейшего изучения инфекций, связанных с этими бактериями. Кроме того, в главе акцентируется внимание на возможных клинических и экологических последствиях, связанных с их распространением.

Заключение и выводы, представленные в работе Андриянова П.А., полностью отражают результаты проведенных исследований. В этом разделе подводятся итоги работы, обобщаются основные результаты, делается акцент на значимости полученных данных для понимания свойств штаммов *E. anophelis* и *D. tsuruhatensis*.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

В автореферате в полной мере представлены ключевые итоги и содержание диссертационного исследования.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

В работе содержатся стилистические неточности и орфографические опечатки, которые, тем не менее, не влияют на общий смысл изложения материала.

Например: «...были обнаружены множественные гены устойчивости...» (стр. 10), «Библиотеки были обрезаны...» (стр. 53), «Кювейт» (Таблица 1), «Идентификация штамма ML-44 была основана на почти полной последовательности гена 16S рРНК....» (стр. 65).

При анализе диссертации появилось ряд вопросов.

1. Последовательность задач и их количество не вполне коррелирует с последовательностью, в которой выстроены выводы, тем не менее, все поставленные задачи выполнены, и это отражено в выводах.
2. На сегодняшний день секвенировано и доступно около 800 геномов различных изолятов *E. anophelis*, в филогенетический анализ было включено всего 13 геномов. Почему и по какому принципу были отобраны именно эти геномы для анализа? Более

того, автором проведен достаточно подробный филогеномный и пангеномный анализ, включающий более 500 доступных геномов в исследовании Andriyanov P. et al. (BMC Genomics, 2024). Почему эти данные не были включены в диссертационную работу?

3. Второй вывод имеет следующую формулировку: «Штамм вида *E. anophelis* впервые выделен на территории России». Стоит отметить, что чуть ранее был выделен клинический изолят *E. anophelis* 122/3 (NZ_JAKRLA000000000, Самара, Россия), геном которого был зарегистрирован в базе данных NCBI GenBank 2022-03-12 (BioSample: SAMN25890303, дата выделения 2020-01-28).
4. В исследовании не были обнаружены мобильные генетические элементы в геномах *E. anophelis* (стр. 77). Проводился ли поиск и типирование CRISPR-систем? Насколько системы CRISPR характерны для данного вида и насколько в целом разнообразен мобилом среди представителей *Elizabethkingia* spp.?
5. Зачем проводилась оценка чувствительности к антибиотикам, активных только в отношении грамположительных микроорганизмов – линезолиду, ванкомицину, эритромицину, кларитромицину, клиндамицину?
6. В недавнем исследовании из Китая (Wu, et al., 2024, 10.1128/spectrum.01780-24) был описан уникальный штамм *E. anophelis*, несущий комплекс генов, кодирующих сидерофор-опосредованную систему захвата железа (yclNOPQ-like genes). Интересно было бы посмотреть наличие этих генов вирулентности в геноме штамма *E. anophelis* ML-44.
7. Для штамма *E. anophelis* выявлена устойчивость к триметоприму-сульфаметоксазолу, это один из основных препаратов, применяемых для терапии инфекций, вызванных данным возбудителем. Какой механизм устойчивости был выявлен? Были ли это мутации в гене, кодирующим собственную дигидрофолатредуктазу? Также хотелось отметить, что определение чувствительности к данному антибиотику сопряжено с рядом особенностей, в частности не всегда достоверно можно определить устойчивость/чувствительность, используя только методы диффузии.

Заключение

Диссертация Андриянова П. А. на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. «Микробиология» представляет собой завершенное научное исследование, посвященное актуальной проблеме изучения эмерджентных бактериальных патогенов. В рамках данной работы представлены доказательства циркуляции на территории России ранее не выделявшихся в РФ или редко выделявшихся видов эмерджентных патогенов *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia*

tsuruhatensis, характеризующихся множественной устойчивостью к антибиотикам; показана их филогенетическая связь со штаммами, выделенными в других странах; получены свидетельства, подтверждающие роль сырого молока как потенциального источника этих и других возбудителей сапронозных инфекций. Таким образом, диссертационная работа Андриянова Павла Алексеевича «Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов эмерджентных сапронозных бактерий *Elizabethkingia anophelis* и *Delftia tsuruhatensis*, обладающих фенотипом множественной лекарственной устойчивости» по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ (№335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016; №1024 от 28.08.2016; 1168 от 01.10.2018; №426 от 20.03.2021; 1539 от 11.09.2021; №1690 от 26.09.2022, N 415 от 18.03.2023, N 1786 от 26.10.2023, N 62 от 25.01.2024 и N 1382 от 16.10.2024, с изменениями и дополнениями, вступившими в силу с 01.01.2025), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Андриянов Павел Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. «Микробиология».

Официальный оппонент

Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», (197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9., 8 (812) 234-60-04, niidi@niidi.ru),

Доктор биологических наук _____ Гостев Владимир Валерьевич

«31» _____ 2025 г.

Подпись Гостева Владимира Валерьевича заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9., 8 (812) 234-60-04, niidi@niidi.ru),

Кандидат медицинских наук,
доцент

_____ Волжанин Валерий Михайлович

«31» _____ 2025 г.

МП