

Отзыв

официального оппонента

д.б.н., член-корреспондента РАН, профессора Алешкина Андрея Владимировича на диссертацию Сияновой Екатерины Алексеевны на тему «Микробиологический мониторинг как основа профилактики и лечения хронической инфекции легких, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, у пациентов с муковисцидозом», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология (биологические науки).

Актуальность темы исследования

Муковисцидоз (МВ) – это одно из наиболее распространенных наследственных заболеваний, обусловленных мутациями гена CFTR, который отвечает за регуляцию трансмембранного транспорта электролитов, в том числе ионов хлора. Известно более 2000 мутаций в этом гене, что приводит к нарушению баланса водной и электролитной фракций секретов, в результате чего секрет становится вязким, затрудняя его отток. Это приводит к расширению выводных протоков желез, атрофии железистой ткани и развитию фиброза. Полиорганные поражения и ранняя инвалидизация пациентов требуют постоянного лечения и диспансерного наблюдения. В последние годы в развитых странах увеличилось количество пациентов с МВ подросткового и взрослого возраста, что свидетельствует о переходе заболевания от фатального к хроническому. Значительное увеличение средней продолжительности жизни и улучшение качества жизни пациентов изменило муковисцидоз - заболевание, угрожающее жизни в детском возрасте, перешло в хроническую патологию у взрослых. В России также наблюдается рост числа пациентов младшего возраста благодаря внедрению неонатального скрининга на МВ.

У новорожденных с муковисцидозом легкие имеют нормальную структуру, но уже в первые годы жизни развивается хроническая инфекция, вызванная такими микроорганизмами, как *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Эти микроорганизмы и связанные с ними воспалительные реакции приводят к повреждениям легких и нарушению их функции, развитию хронических инфекционных осложнений.

Доля больных муковисцидозом, хронически инфицированных *P. aeruginosa*, по РФ составляет 36,1%. При этом эти значения различаются в зависимости от региона, так в Сибирском Федеральном округе доля больных составляет 39%, в Центральном – 32% , а в Южном достигает 56%. Более 90% летальных исходов связано с осложнениями хронической инфекции легких. Хроническая инфекция дыхательных путей является ключевым фактором, влияющим на выживаемость, поэтому всестороннее изучение микробиологических характеристик бактерий *P. aeruginosa* при этой инфекции легких является актуальным.

Антибиотикотерапия, направленная против значимых бактериальных патогенов, является важным компонентом лечения хронического бронхолегочного процесса при муковисцидозе.

Однако в процессе лечения бактерии могут развивать устойчивость к антибиотикам, что способствует их длительному выживанию в легких - персистенции и усложняет процессы уничтожения возбудителя. Способность образовывать биопленки является признаком хронической инфекции, так как эти структуры защищают бактерии от фагоцитов и антибиотиков, что делает их менее доступными для терапии.

В России наблюдается проблема лабораторной диагностики инфекций у пациентов с муковисцидозом. Это связано с тем, что большинство бактериологических лабораторий проводят исследования по стандартным схемам, не учитывая микробиологические особенности хронической синегнойной инфекций у таких больных. В результате это затрудняет установление точного микробиологического диагноза при муковисцидозе.

Таким образом, в работе обоснованно акцентируется внимание на важности проведения микробиологического мониторинга инфекции, вызванной *P. aeruginosa* как одного из ведущих патогенов у пациентов с муковисцидозом. Актуальность темы обусловлена высокой частотой инфекций, вызванных данным микроорганизмом, и его устойчивостью к антибиотикам. Эти факторы делают необходимым разработку новых подходов к диагностике и лечению хронической инфекции легких, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, что подчеркивает важность и актуальность диссертационной работы Сияновой Е.А.

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

Научные положения диссертационной работы обоснованы значительным массивом отечественных и зарубежных публикаций, действующих нормативно-методических документов, использованных автором в качестве теоретической и методологической базы. Достоверность полученных результатов основана на результатах анализа обширного фактического материала, обеспечивается большим объемом проведенных исследований и использованием в исследованиях молекулярно-генетических

методов и Maldi-TOF спектрометрии.

Научная новизна исследования

Автором на основании анализа молекулярно-генетических данных, полученных в ходе исследования популяции бактерий *P. aeruginosa*, выделенных от больных с МВ на территории России внесены в международную базу данных PubMLST сведения о 34 изолятах *P. aeruginosa* и описаны ранее неизвестные генотипы *P. aeruginosa*: ST4037, ST3993 и ST4038. Показано распространение международных клонов среди штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих у пациентов с муковисцидозом в России (ST233, ST235, ST245, ST274, ST273 и ST381).

По данным, полученным в ходе изучения биологических свойств собранных в коллекцию штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом, и сравнения с результатами исследования штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих муковисцидозом, выявлены характерные фенотипические особенности изолятов *P. aeruginosa*. Изучение распространенности генов металло-β-лактамаз дало автору возможность оценить их значение для выявления эпидемически значимых штаммов *P. aeruginosa*. Что позволило автору усовершенствовать алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, с обязательным использованием методов MALDI-TOF или ПЦР, необходимых для идентификации изолятов атипичного фенотипа *P. aeruginosa*, и методов ПЦР и ПЦР-РеалТайм для выявления МβЛ - маркеров эпидемически значимых штаммов.

Выявление вспышки госпитальной инфекции, вызванной штаммом *P. aeruginosa* ST235, и проведенный детальный мониторинг окружающей домашней среды детей с муковисцидозом, подчеркивает важность контроля за распространением эпидемически значимых клонов и профилактических мер в медицинских учреждениях и в условиях вне стационара.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая и практическая значимость работы не вызывает сомнений и заключается в разработке рекомендаций по профилактике и контролю инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, как в стационарных, так и в домашних условиях. Это особенно актуально для пациентов с муковисцидозом, учитывая их предрасположенность к инфекциям. Рекомендации по дезинфекции и мониторингу микрофлоры домашней среды могут значительно улучшить качество жизни пациентов.

Материалы, полученные в результате диссертационной работы, послужили основой лекционного курса для студентов «МГИМО-МЕД» и

аспирантов ФБГУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России по направлениям «микробиология» и «эпидемиология».

Информация о микробиологическом статусе пациента передается лечащим врачам, что позволяет организовать прием пациентов в зависимости от особенностей микрофлоры и предотвратить их перекрестное инфицирование.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация Сияновой Екатерины Алексеевны по своему содержанию соответствует паспорту научной специальности 1.5.11 «Микробиология», в том числе пунктам: пп.11 (Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ), 12 (Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности), 20 (Санитарная микробиология).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Основные положения диссертационной работы опубликованы и представлены на научных форумах международного и всероссийского уровней. По материалам диссертационной работы опубликовано 23 публикации, в том числе 6 статей, входящих в базы данных WoS, Scopus и РИНЦ, а также в перечень рецензируемых научных изданий рекомендуемых ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа изложена на 193 страницах, содержит все необходимые разделы: введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, заключение, а также выводы. Диссертация иллюстрирована 42 рисунком, включает 24 таблицы. Список литературы включает 197 источников, в том числе 61 отечественных, 136 – иностранных.

Введение раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку его цели и задач исследования, научную новизну, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, информацию о публикациях автора и его личный вклад в исследование.

Глава 1 «Обзор литературы» представляет собой углубленный теоретический анализ проблемы, рассматриваемой в диссертации. В первой части автор подробно описывает характеристику хронической инфекции легких у больных с муковисцидозом, и акцентирует внимание на микробиологических агентах, осложняющих течение МВ. Далее рассматриваются культуральные и морфологические свойства *P. aeruginosa*, подчеркивается способность этого микроорганизма к выживанию (наличие факторов патогенности бактерий и способность к формированию биопленок *P. aeruginosa*). Следующая часть посвящена резистентности *P. aeruginosa* к антимикробным препаратам и

дезинфицирующим средствам. Автор подробно описывает классы активных веществ в отношении микроорганизмов и механизмы, лежащие в основе резистентности к антибиотикам и дезинфектантам. Далее приводится анализ распространения различных генотипов *P. aeruginosa* в мире и РФ по данным международной базы Pub MLST. В целом, обзор литературы является важным вкладом в понимание проблемы, а полученная фактологическая основа позволила автору определить приоритетные направления своих исследований.

Глава 2 «Материалы и методы» дает полное представление об объеме, дизайне, материале и методах исследования.

Глава 3: «Микробиологические характеристики хронической инфекции легких, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, у пациентов с муковисцидозом» представляет собой углубленный анализ микрофлоры нижних дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом за период с 2012 по 2021 годы. Автор демонстрирует особенности инфекции *P. aeruginosa*. Охарактеризованный состав ассоциаций *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами в различных возрастных группах является важным вкладом в понимание патогенеза хронической инфекции. Проведенный анализ анкетных данных о тяжести заболевания и возрасте постановки диагноза подчеркивает значимость ранней диагностики и мониторинга состояния пациентов.

Результаты наблюдения за пациентами в динамике показывают, что моноинфекция *P. aeruginosa* выявлена у 34% детей, что свидетельствует о высокой распространенности этого патогена. Автор фиксирует раннюю колонизацию *P. aeruginosa*, что может негативно сказаться на прогнозе заболевания. Длительная персистенция ассоциаций возбудителей, особенно с *S. aureus*, подчеркивает необходимость комплексного подхода к лечению.

Изучение фенотипических особенностей штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ, дает новые данные о различиях между изолятами. Выявление атипичных фенотипов у пациентов с муковисцидозом подчеркивает необходимость детальной разработки алгоритма их идентификации для более эффективного лечения.

Результаты, представленные в 4 главе представляют собой значимый вклад в изучение молекулярно-генетического мониторинга *P. aeruginosa* у пациентов с муковисцидозом. Автором проведен анализ 233 штаммов, выделенных с 2005 по 2022 годы, что позволяет получить представление о генетическом разнообразии и распространении данного патогена. Выявление 145 различных кластеров возбудителя и регистрация трех новых сиквенс-типов в международной базе PubMLST подчеркивают актуальность и важность проведенного исследования.

Одновременное использование методов RAPD-PCR и MLST продемонстрировали целесообразность и высокую эффективность в определении генотипов, что подтверждает необходимость их использования в практике микробиологических лабораторий. Интересно, что у 86% пациентов выделены уникальные генотипы, что может свидетельствовать о локальных особенностях распространения инфекции. Анализ фенотипических свойств изолятов, включая множественную антибиотикорезистентность, также важен для понимания клинической значимости штаммов. Кроме того, результаты о длительной персистенции в течение 15 лет бактерий *P. aeruginosa* в дыхательных путях подчеркивают необходимость дальнейшего мониторинга и контроля за инфекциями в стационарах. Выявлена вспышка внутрибольничной инфекции, вызванной штаммом ST235.

В этой главе также представлены результаты исследования чувствительности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ. Сиянова Е.А. провела мониторинг антибиотикочувствительности, что позволяет получить детальную картину изменения резистентности бактерий за период с 2012 по 2022 годы. Результаты показывают, что мультирезистентность наблюдается у значительной части изолятов: 43% у детей и 61% у взрослых. Это подчеркивает проблему резистентности к антимикробным препаратам данной популяции и необходимость разработки новых стратегий для лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. Анализ чувствительности к антибиотикам демонстрирует, что наиболее эффективными препаратами являются меропенем, тобрамицин и колистин, особенно у детей, что важно для клинической практики. Однако высокая резистентность к гентамицину и другим антибиотикам вызывает серьезные опасения. Динамика изменений резистентности у отдельных пациентов, включая случаи смены генотипов и приобретения устойчивости к антибиотикам, подчеркивает адаптивные возможности *P. aeruginosa*. Примеры, приведенные в тексте, иллюстрируют, что штаммы могут как терять, так и приобретать резистентность, что требует постоянного мониторинга и адаптации терапевтических подходов.

Выявление новых генов резистентности, таких как *crpP*, и их связь с мобильными генетическими элементами подчеркивают важность генетического мониторинга. Это также указывает на потенциальные риски горизонтального переноса генов резистентности между различными штаммами и другими бактериями.

Далее в этой главе Сияновой Е.А. проведен многоступенчатый анализ детекции генов *MβL* у штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с муковисцидозом, используя фено- и генотипические методы на разных этапах

исследования. Полученные данные подчеркивают важность мониторинга антибиотикорезистентности, и выявления генов MβL Vim типа, которые могут служить маркером госпитальной инфекции, что особенно актуально для пациентов с муковисцидозом. Рекомендации по использованию различных методов типирования полезны, необходимо учитывать возможность ложноположительных результатов и стандартизировать подходы в микробиологических исследованиях.

5 глава «Микрофлора окружающей среды больных МВ вне стационара» состоит из двух частей: характеристики условий проживания детей и мониторинга микрофлоры внешней среды в домашних условиях проживания пациентов. Исследование условий проживания детей с муковисцидозом представляет собой важный шаг к пониманию факторов, способствующих инфицированию данной группы пациентов. Анкета, разработанная автором совместно с педиатрами-пульмонологами, охватывает ключевые аспекты быта и гигиенических и лечебных ежедневных процедур, что позволило получить ценные данные о влиянии домашней среды на здоровье детей. Результаты показывают высокую степень риска инфицирования, особенно среди семей, не использующих дезинфицирующие средства для ухода за небулайзерами и не соблюдающих рекомендованные сроки дезинфекции. Автор акцентирует внимание, что наличие хронических бронхолегочных заболеваний у родственников также увеличивает вероятность передачи инфекции.

Результаты мониторинга микрофлоры внешней среды показывают значительную обсемененность объектов, что подчеркивает необходимость строгого контроля гигиенических условий. Автором выявлено, что основными резервуарами *P. aeruginosa* являлись сливы раковин, а также выявлена контаминация синегнойной палочкой масок небулайзеров и зубных щеток. Методология исследования, включающая использование RAPD-PCR для анализа генетического родства изолятов, является обоснованной и актуальной. Данные, полученные методом ПЦР при изучении изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из разных объектов (зубные щетки и раковины), указывают на возможность циркуляции одного генотипа в домашней среде. Автор обращает внимание на недостаточную эффективность дезинфекции, что требует более тщательного подхода к выбору дезинфицирующих средств и времени обработки. Недостаточная дезинфекция объектов может привести к риску повторного инфицирования *P. aeruginosa* и другими патогенами, что требует разработки эффективных профилактических мер. Рекомендации по обучению родителей и регулярному мониторингу микробиологического состояния являются своевременными и необходимыми. Исследование также поднимает вопросы о

необходимости пересмотра стандартов дезинфекции в домашних условиях для детей с МВ. Важно продолжать исследование в динамике, чтобы оценить долгосрочные последствия предложенных мер.

Глава 6, посвящена исследованию чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам. Бактерии *P. aeruginosa* обладают высокой устойчивостью к различным условиям окружающей среды, включая дезинфицирующие растворы, применяемые в медицинской практике, и способны длительно сохранять жизнеспособность на медицинских инструментах (до 12 суток на металлических поверхностях) и в дистиллированной воде (до 130 суток). Автор диссертации подчеркивает, что в отделениях Центров Муковисцидоза лечатся пациенты с хроническими инфекциями легких, которые могут быть источниками мультирезистентных штаммов, в результате антибиотикотерапии и постоянного применения дезинфектантов. Поэтому изучение чувствительности *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам становится особенно актуальным. В проведенном исследовании была подтверждена высокая устойчивость изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ. Анализ устойчивости изолятов к трем изученным дезинфицирующим средствам проведенный автором, выявил, что для обеззараживания изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих МВ, требовались меньшие концентрации растворов. Результаты показали, что длительность обработки и концентрация дезинфицирующих средств значительно влияют на эффективность их действия. Использование 70% этилового спирта продемонстрировало высокую эффективность при увеличении времени обработки до 45 секунд. Дезинфицирующие средства «Торихлор» и «Изумруд» также показали значительную активность, особенно при повышенных концентрациях. Эти данные подчеркивают важность ротации дезинфицирующих средств и адаптации протоколов дезинфекции в зависимости от уровня устойчивости штаммов. Таким образом, результаты исследования могут существенно повысить эффективность профилактики инфекций респираторного тракта, вызванных *P. aeruginosa*, у пациентов с муковисцидозом.

В главе 7 «Меры профилактики инфицирования бактериями *Pseudomonas aeruginosa* в стационаре и в домашних условиях проживания пациентов МВ» приводится комплексное решение поставленной проблемы – разработанный автором алгоритм микробиологического мониторинга хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом, вызванной *P. aeruginosa*. Внимание акцентируется на необходимости раннего выявления и регулярного мониторинга синегнойной инфекции, что критически важно для улучшения состояния пациентов.

Включение фенотипических особенностей *P. aeruginosa* в процесс диагностики позволит повысить точность идентификации штаммов. Автор особенно подчеркивает, что на практике микробиологи чаще всего встречаются типичные формы *P. aeruginosa*. Идентификация таких форм не вызывает трудностей благодаря ряду характерных биохимических свойств, которые служат дифференцирующими критериями. Однако эти критерии не подходят для идентификации изолятов *P. aeruginosa* с атипичным фенотипом, выделенных из нижних дыхательных путей пациентов с муковисцидозом, имеющих мукоидный фенотип, не продуцирующие пигмент и не обладающие запахом, а также характеризующиеся медленным ростом. В таких случаях стандартное время инкубации (24-48 часов) для посевов оказывается недостаточным. Поэтому автор отмечает необходимость для точной идентификации бактерий *P. aeruginosa* с атипичным фенотипом увеличения времени инкубации и обязательно применять методы, такие как MALDI-TOF и ПЦР.

Контроль за антибиотикорезистентностью является ключевым для эффективного лечения. Также важно учитывать дезинфекцию домашней среды, что может существенно снизить риск инфицирования. Разработка рекомендаций для родителей по профилактике инфицирования является значимым дополнением. Интеграция новых технологий, таких как молекулярно-генетические методы, необходима для выявления генов резистентности и обнаружения эпидемических клонов *P. aeruginosa*. В конечном итоге, успешная реализация данной схемы алгоритма может значительно улучшить диагностику, лечение и качество жизни пациентов с муковисцидозом.

Общая структура диссертационной работы ясна и логична, что делает результаты доступными для широкой аудитории.

В заключении представлены резюмирующие положения диссертационной работы.

Выводы соответствуют поставленным задачам, научно обоснованы, содержат элементы научной новизны и логично вытекают из содержания работы. Диссертация и автореферат написаны хорошим литературным языком, оформлены в соответствии с установленными требованиями.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Сияновой Екатерины Алексеевны нет. Однако хотелось бы отметить следующее: перечисленные в работе бактериофаги НПО «Микроген» не являются

диагностическими. Дополнительно при их использовании с целью определения чувствительности надо учитывать, что от серии к серии состав фагов внутри этих препаратов может изменяться производителем. В связи с этим есть вопросы уточняющего характера:

1. Использовали ли вы в своих исследованиях разные серии одного и того же препарата?

2. Рассматривали ли Вы фаги в качестве биодезинфектантов в случае устойчивых к химическим дезинфектантам штаммам синегнойной палочки?

3. Использовали ли фаги в качестве средств профилактики инфекционных обострений у данной категории пациентов?

Заключение

Диссертационная работа Сияновой Екатерины Алексеевны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (биологические науки), выполненная под руководством научного руководителя, доктора медицинских наук Чернуха Марины Юрьевны является законченной научно-квалификационной работой, содержащей актуальное решение проблемы профилактики и лечения хронической инфекции легких, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, у пациентов с муковисцидозом с помощью разработанной схемы мониторинга, который должен включать не только бактериологические исследования, но и мониторинг антибиотикорезистентности возбудителя, мониторинг чувствительности к дезинфектантам с целью коррекции режимов дезинфекции, мониторинг микрофлоры домашней среды для предотвращения распространения *P. aeruginosa* и предупреждения инфицирования больных. Таким образом, диссертационная работа Сияновой Екатерины Алексеевны «Микробиологический мониторинг как основа профилактики и лечения хронической инфекции легких, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, у пациентов с муковисцидозом» 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

Сиянова Екатерина Алексеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Директор по новым продуктам
ООО «Орфан-Био»,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
профессор РАН

Алешкин

Алешкин Андрей Владимирович

«28» мая 2025 г.

Подпись Алешкина Андрея Владимировича заверяю:
Генеральный директор ООО «Орфан-Био»
Кандидат технических наук

И.М. Волкова

Волкова И.М.

Общество с ограниченной ответственностью «Орфан-Био» (ООО «Орфан-Био»), 354340, РФ, Краснодарский край, Сириус ф.т., Сириус пгт., Триумфальный пр-д, д. 1, помещ. 2-037/16.
Тел. +7 911 220-28-8
Эл. почта: i.volkova@orphanbio.ru

