

Отзыв

официального оппонента

доктора медицинских наук, доцента Лямина Артема Викторовича 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», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Кистозный фиброз (муковисцидоз) – тяжелое генетическое заболевание, которым страдает примерно 1:9000 новорожденных в России, 1:5000 человек новорожденных США. В Европе частота заболевания муковисцидозом составляет в среднем 1:2000-1:3000 новорожденных.

В настоящее время показано, что продолжительность жизни у больных МВ зависит от этиологии хронической легочной инфекции. У детей больных муковисцидозом, формируются постоянные очаги хронической легочной инфекции, основными возбудителями которой являются *P. aeruginosa* и *S. aureus*, а также *B. ceratia complex (BCC)*, *Achromobacter spp*, *S. maltophilia*. В течение последних десятилетий было разработано множество различных терапевтических подходов, которые оказали существенное влияние на прогноз и снижение инфицирования. Однако динамика структуры микрофлоры респираторного тракта по данным регистров (Муковисцидоз в РФ) за 2011–2022 гг. показывает возрастание доли пациентов, хронически инфицированных *P. aeruginosa* с 30% (2012 год) до 36% (2022). Это связано с различными факторами.

К факторам, затрудняющим возможность эрадикации бактерий *P. aeruginosa* в респираторном тракте больных с муковисцидозом, относятся наличие у бактерий мукоидных фенотипов, их антибиотикорезистентность, возможность формирования биопленок, затрудняющих проникновение антибактериальных препаратов. Кроме того, одним из важных факторов является распространение мультирезистентных эпидемически значимых клонов *P. aeruginosa*, в том числе имеющих гены металло-β-лактамаз (MβL). Что представляет серьезную угрозу в процессе лечения больных МВ и инфекционного контроля, так как карбапенемы являются препаратами выбора для лечения тяжелых обострений.

Важнейшим условием эффективности профилактических мероприятий – необходимость повышения уровня диагностика инфекции,

вызванной *P. aeruginosa*, осложненной атипичными фенотипами, адекватная антибиотикотерапия для предупреждения хронического инфицирования или предотвращение прогрессирования бронхолегочного процесса при хронической синегнойной инфекции, а также меры предупреждения инфицирования в больничных и внебольничных условиях.

Одним из направлений решения комплекса данных проблем может быть предложенная и разработанная автором схема микробиологического мониторинга *P. aeruginosa* у пациентов с МВ на основе микробиологической характеристики изолятов, выделенных у пациентов с муковисцидозом при хронической инфекции легких.

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

Научные положения и выводы, представленные автором, основаны на результатах экспериментальных данных, полученных в ходе анализа микробиологических и молекулярно-генетических характеристик штаммов *P. aeruginosa*, включенных в уникальную коллекцию. Понятный дизайн работы, достаточный объем материала, корректная статистическая обработка полученных результатов, математический анализ с использованием современного программного обеспечения позволили диссертанту решить все поставленные в работе задачи, обосновать положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации и достичь поставленной цели.

Диссертант проводил исследования с базой данных штаммов, собранных в период с 2005 по 2022 годы, выделенных из биологического материала, полученного от 636 пациентов с МВ. Всего исследованы 472 штамма *P. aeruginosa*, 402 из которых сохранены в коллекцию.

Современные микробиологические методы исследования, выполненные на сертифицированном оборудовании, обеспечили высокую степень обоснованности полученных результатов в диссертационном исследовании, выполненном Е.А. Сияновой. Основные результаты работы доложены и обсуждены на 13 международных и всероссийских конференциях и конгрессах.

Таким образом, выносимые автором положения и выводы справедливы и основаны на результатах экспериментальных данных, а также на анализе литературных данных. Объем проведенной работы соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе Сияновой Е. А. впервые на территории России были обнаружены новые, ранее не описанные генотипы *P. aeruginosa*: ST4037,

ST3993 и ST4038. Эти данные были внесены в международную базу PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity - <https://pubmlst.org/>). В общей сложности в PubMLST представлена информация о 34 изолятах *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с муковисцидозом в России. Также был выявлен новый аллель гена «домашнего хозяйства» *trpE*, который стал известен как *trpE317* и входит в схему мультилокусного типирования.

На основе полученных результатов автором предложены дополнительные шаги для алгоритма микробиологической диагностики ХИЛ у больных муковисцидозом: обязательно использовать методы MALDI-TOF или ПЦР для идентификации изолятов, а также методы ПЦР и ПЦР-РТ для характеристики МБЛ-маркеров эпидемически значимых штаммов.

Также было показано, что среди штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих у пациентов с муковисцидозом в России, распространены международные клоны высокого эпидемического риска: ST233, ST235, ST245, ST274, ST273 и ST381. Впервые была охарактеризована вспышка госпитальной инфекции, вызванной штаммом *P. aeruginosa* ST235, среди детей с муковисцидозом.

Кроме того, в России был проведён детальный мониторинг домашней среды детей с муковисцидозом, в ходе которого было выявлено эпидемиологическое значение ряда предметов – небулайзеров, стоков раковин и чистящих поверхностей зубных щеток – как возможных резервуаров штаммов *P. aeruginosa*, которые могут приводить к вторичной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая и практическая значимость данного исследования заключается в создании схемы микробиологического мониторинга ХИЛ, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, с целью обеспечения персонализированного подхода к профилактике и лечению ХИЛ у пациентов с муковисцидозом.

Разработаны рекомендации по проведению профилактических мероприятий, направленных на предотвращение распространения инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, как в стационарных, так и в домашних условиях. Полученные данные будут учтены при обновлении Национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия», а также в клинических рекомендациях «Кистозный фиброз (муковисцидоз)».

На основании полученных данных о чувствительности *P. aeruginosa* к дезинфицирующим средствам обоснованы оптимальные режимы дезинфекции различными препаратами для предотвращения распространения штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных муковисцидозом.

Информация о микробиологическом статусе пациентов передается лечащим врачам-пульмонологам, что позволяет организовать прием пациентов в зависимости от характера микрофлоры и исключить их перекрестное инфицирование.

Полученные результаты используются в лекционном курсе для студентов и аспирантов по специальностям «микробиология» и «эпидемиология».

Данные о антибиотикорезистентности штаммов *P. aeruginosa* были включены в базу данных Референс-центра ФБГУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России для мониторинга распространения антибиотикорезистентности. Собрана и охарактеризована коллекция штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с муковисцидозом. Два полностью секвенированных штамма *P. aeruginosa* были депонированы в коллекцию ФБГУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (GIMC5040:PA85B, GIMC5041:PA431-2).

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация Е.А. Сияновой является законченной научно-квалификационной работой, которая по целям, задачам, методологическому подходу и полученным результатам соответствует паспорту научной специальности 1.5.11 «Микробиология» пунктам: п.11 (Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ), п.12 (Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности), п.20 (Санитарная микробиология).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Материалы диссертации полно представлены в печати. 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.

Структура и содержание диссертации

Диссертация написана по традиционному плану и соответствует современным стандартам работа такого уровня. Работа изложена на 193 страницах, иллюстрирована 42 рисунком, включает 24 таблицы. Содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и обсуждение полученных результатов, а также выводы. Список литературы включает 197 источников (61 – отечественные, 136 – зарубежные).

Введение включает общее представление о выполненной работе и демонстрирует актуальность выбранного направления, цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, которые будут представлены на защите. Здесь же представлена информация о публикациях автора по теме диссертации и отражен его личный вклад в исследование.

Раздел «Обзор литературы» (глава 1) содержит подробный теоретический обзор по проблеме диссертационной работы. В данной главе дана характеристика хронической инфекции легких у больных с муковисцидозом, описаны микробиологические агенты, осложняющие течение МВ. Автор приводит описание особенностей биологии *P.aeruginosa*, а также ее клиническое значение для человека. Обзор литературы содержит описание факторов патогенности бактерий и формирование биопленок *P.aeruginosa*. Рассмотрено значение резистентных штаммов *P.aeruginosa* к антимикробным препаратам и устойчивость *P.aeruginosa* к дезинфицирующим средствам.

Представлена геномная структуры *P.aeruginosa* и показан анализ данных по международной базе Pub MLST о распространении различных сиквенс-типов *P.aeruginosa*, выделенных от больных с муковисцидозом во всем мире и России. Материалы обзора содержат современный уровень знаний по этим вопросам и непосредственно связаны с содержанием собственных исследований

В главе 2 отражены материалы и методы исследования. Автор использовала современные микробиологические, молекулярно-генетические, эпидемиологические, а также статистические методы, которые позволили ей изучить микробиологические характеристики изолятов *P. aeruginosa*, усовершенствовать алгоритм диагностики ХИЛ у пациентов с МВ, вызванной *P. aeruginosa*, и создать схему микробиологического мониторинга ХИЛ, вызванной бактериями *P. aeruginosa*.

В главе 3 отражены полученные в ходе работы результаты многолетнего анализа микробиоты нижних дыхательных путей у 636 пациентов с МВ. Приведены данные о этиологической структуре респираторной инфекции: доли моноинфекции и ассоциации с *P. aeruginosa*. Охарактеризован состав ассоциаций *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами в 3 детских возрастных группах пациентов с муковисцидозом. Проведен анализ анкетных данных о тяжести заболевания и возрасте постановки диагноза «Муковисцидоз» и наличием ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*. Проанализированы сведения по молекулярно-генетической диагностики мутацией гена CFTR у детей с хронической синегнойной инфекцией. Показано, что ранняя колонизация

бактериями *P. aeruginosa* увеличивает показатель смертности у больных, имеющих «тяжелые» мутации гена CFTR.

В ходе микробиологического мониторинга Е.А. Сиянова выявила длительную персистенцию ассоциаций возбудителей ХИЛ при МВ. Наиболее часто встречалась *P. aeruginosa* в ассоциации с *S. aureus*. Длительность персистенции такой ассоциации наблюдала от 3 мес. до 7 лет.

Автором изучены характерные фенотипические особенности *P. aeruginosa* из коллекции штаммов, выделенных из мокроты детей и взрослых больных муковисцидозом в сравнении с фенотипами *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов, не страдающих МВ.

Диссертант показывает, что большинство изолятов *P. aeruginosa* типичного фенотипа легко распознаются на питательной среде на основе морфологических характеристик колоний и типичного пигментообразования. Однако из образцов мокроты респираторного тракта больных муковисцидозом выделены изоляты *P. aeruginosa* атипичного фенотипа (мукоидного фенотипа, медленно растущими, имели колонии SCV-фенотипа, не продуцировали пигменты). Таким образом, автор доказывает необходимость детальной разработки алгоритма идентификации изолятов *P. aeruginosa* атипичного фенотипа для его использования при диагностике и лечении инфекции.

В главе 4 приведены результаты молекулярно-генетического мониторинга ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, у пациентов с МВ. Автором выявлено 145 различных кластера возбудителя хронической синегнойной инфекции у больных муковисцидозом. В результате мониторинга у пациентов с МВ при ХИЛ были выделены и охарактеризованы 20 сиквенс-типов *P. aeruginosa* (ST233, ST235, ST245, ST273, ST274, ST281, ST381, ST390, ST575, ST612, ST667, ST794, ST 803, ST1050, ST1074, ST2123, ST2390, ST3993, ST4037, ST4038). Среди которых автор показала шесть высококонтагиозных и эпидемически значимых сиквенсов (ST 233, ST235, ST 245, ST 274, ST 273, ST 381). Автором зарегистрированы в базе PubMLST данные о 34 изолятах *P. aeruginosa*, выделенных на территории РФ. Три новых генотипа: ST 3993, ST 4037, ST 4038.

В результате исследования Сияновой Е.А. с помощью методов ПЦР, MLST и полногеномного секвенирования установлена персистенция бактерий *P. aeruginosa* в нижних дыхательных путях больных муковисцидозом от 6 мес. до 15 лет.

При исследовании изолятов в динамике проанализировано изменение показателей антибиотикочувствительности в динамике при хроническом течении инфекции у 27 больных с МВ. Установлено, что в процессе

длительной персистенции, в течение более 14 лет, изоляты *P. aeruginosa* приобретали устойчивость к лекарственным препаратам.

В главе 4 также продемонстрированы результаты исследования чувствительности изолятов *P. aeruginosa*, выделенных пациентов с МВ, как от детей, так и от взрослых. Автор показал, что наибольшую эффективность проявили антимикробные препараты меропенем, тобрамицин и колистин. Колистин также проявил высокую эффективность в отношении изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от взрослых, а к азтреонаму и пиперациллин-тазобактаму изоляты, выделенные от взрослых были чувствительны при увеличенной экспозиции.

Исследование полных геномов бактерий *P. aeruginosa* в нижних дыхательных путях больных МВ при ХИЛ показало, что наряду с генами резистентности к антибактериальным препаратам, обеспечивающим низкую чувствительность к антибиотикам, важную роль играют различные факторы вирулентности, в том числе система SSTT и система эффлюкса, экспрессия которой регулируется с помощью регуляторной системы Quorum sensing (QS). У изолята 85В (ST 235) был выявлен ген *EcoU*, имеющий острый цитотоксический эффект на эпителиальные клетки.

С помощью полногеномного секвенирования показано наличие в геноме позднего изолята *P. aeruginosa* 85В интегрона 2 класса с генами *sull1*, *dfrB5*, определяющими устойчивость к сульфонамиду и триметоприму, и ген *qacEdelta1* – к ЧАС. Вероятно, что этот интегрон был приобретен в процессе горизонтального переноса гена в процессе персистенции в течение 12 мес.

В 5 главе автор дала подробную характеристику условий проживания детей с муковисцидозом и показала результаты исследования микрофлоры окружающей домашней среды больных детей МВ с ХИЛ, вызванной *P. aeruginosa*, вне стационара. Дана оценка проводимых профилактических мер в семьях детей больных муковисцидозом. Исследования эффективности дезинфекции небулайзеров и раковин в обследованных семьях показали, что они являются недостаточными. После проведения дезинфекции с поверхности 25% объектов небулайзера были выделены микроорганизмы.

Сияновой Е.А. были выявлены домашние очаги *P. aeruginosa*. При этом основными резервуарами являлись сливы раковин. В результате эрадикация *P. aeruginosa* может оказаться неэффективной. Зубные щетки и небулайзерные маски при их ненадлежащем уходе также могут быть факторами передачи, что может способствовать реинфицированию.

Исследование изолятов *P. aeruginosa* молекулярно-генетическими методами позволило автору выявить циркуляцию одного генотипа бактерий *P. aeruginosa* в домашней окружающей среде больного ребенка с МВ.

Циркуляция бактерий *P. aeruginosa* в домашней среде может привести к повторному инфицированию после антибактериальной терапии. В результате эрадикация *P. aeruginosa* может оказаться неэффективной.

В главе 6 Е.А. Сияновой показано исследование чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к 70% этиловому спирту, и дезинфектантам трех групп. Автор показала необходимость обработки 70% этиловым спиртом медицинских перчаток и пластика в течение более 45 секунд. Выявлено, что заявленный производителем режим обеззараживания дезинфектанта на основе ЧАС и альдегида оказался недостаточным для изолятов всех трех исследованных групп штаммов *P. aeruginosa*, включая множественнорезистентный штамм *P. aeruginosa* ST235, имеющий эпидемическое значение.

Кроме того, в ходе исследования выявлена фенотипическая гетерогенность генотипически идентичных изолятов не только по отношению к антибиотикам, но и к дезинфицирующим средствам.

В главе 7 автор описывает разработанные меры профилактики инфицирования бактериями *P. aeruginosa* в стационаре и в домашних условиях проживания пациентов с МВ. Приводится схема алгоритма микробиологического мониторинга для выявления, регистрации и контроля инфекции нижних дыхательных путей, вызванной бактериями *P. aeruginosa*, у больных муковисцидозом для профилактики синегнойной инфекции с подробным поэтапным алгоритмом действий. Автор указывает на необходимость персонализированного подхода при профилактике и лечении пациентов с МВ в зависимости от микробиологического статуса нижних дыхательных путей, меняющихся показателей состава ассоциаций *P. aeruginosa* с другими микроорганизмами, наличии моноинфекции, изменения данных антибиотикограмм, выявления генов резистентности и обнаружения эпидемических клонов *P. aeruginosa*.

Схема мониторинга включает усовершенствованный алгоритм идентификации *P. aeruginosa*. Автор акцентирует внимание на том, что для идентификации культур с атипичными фенотипами обязательно применять методы ПЦР-диагностики или MALDI-ToF масс-спектрометрию.

Автор доказывает, что мониторинг должен включать не только бактериологические исследования с целью идентификации, но и мониторинг антибиотикорезистентности штаммов, включающий выявление генов *mβL*, мониторинг чувствительности к дезинфектанту с целью коррекции режимов дезинфекции, а также мониторинг микрофлоры внешней домашней среды.

Заключение и выводы в работе Е.А. Сияновой в полной мере отражают результаты исследований, соответствуют задачам и положениям, выносимым на защиту.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации. По оформлению отвечает требованиям Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Представленная к защите диссертационная работа Е.А. Сияновой представляет собой исследование с привлечением значительного объема данных.

Существенные замечания по оформлению рукописи и языку изложения отсутствуют. Диссертация носит внутренне целостный и заверченный характер. Однако следует отметить, что представленные в диссертации на высоком методическом уровне практические рекомендации и перспективы разработки темы диссертационного исследования не выделены отдельные подразделы, что было бы удобно с точки зрения восприятия.

Оценивая диссертационную работу положительно, хотелось бы задать диссертанту уточняющие вопросы, вызванные теоретическим и научным интересом:

1. С чем Вы связываете значительную гетерогенность популяции *P. aeruginosa*, выделенной от пациентов с муковисцидозом при сравнении с штаммами, выделенными от пациентов с другой патологией?

2. Были ли в Вашем исследовании выявлены фенотипические особенности наиболее часто встречающихся сиквенс-типов *P. aeruginosa*, особенно для новых генотипов ST 4037, ST 3993, ST 4038? И если да, то на какие из них следует обратить особое внимание при работе с биологическим материалом от пациентов с муковисцидозом.

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 задачи 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.

Доктор медицинских наук, доцент, профессор
кафедры медицинской микробиологии и
иммунологии федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Самарский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Лямин Артем Викторович

«26» мая 2025 г.



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89,
Тел. +7 (846) 374-10-04; Эл. почта: a.v.lyamin@samsmu.ru