

УТВЕРЖДАЮ
и.о. ректора ФГБОУ ВО РостГМУ
Минздрава России
кандидат медицинских наук
О. Б. Старжинская
« 17 » 903 2025 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертации Самойловой Анны Андреевны «Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы выполненной работы

Klebsiella pneumoniae — условно-патогенный микроорганизм, способный вызывать тяжелые и опасные для жизни инфекции, такие как пневмония, бактериемия и осложнённые инфекции мочевыводящих путей. В настоящее время выделяют два патотипа данного вида: классический *K. pneumoniae* (сКР) и гипервирулентный *K. pneumoniae* (hvКР). Патотипы имеют клинические, географические и молекулярные различия. Изоляты сКР обычно вызывают внутрибольничные инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом или сопутствующими заболеваниями, часто приобретают детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам. Изоляты способны вызывать инвазивные инфекции у людей с нормальным иммунным статусом. Подобные инфекции характеризуются быстрым метастатическим распространением и образованием гнойных абсцессов.

Серьезную проблему представляет появление изолятов *K. pneumoniae*, обладающих одновременно детерминантами устойчивости к

антибактериальным препаратам и факторами вирулентности h_vKP. Инфекции, вызываемые подобного рода бактериями, являются наиболее опасными и трудно поддаются лечению. Все это указывает на необходимость надзора за штаммами *K. pneumoniae* и осуществление более строгих мер контроля для предотвращения распространения этих штаммов в госпитальной и внебольничной среде.

Таким образом, идентификация вирулентных и резистентных к антибактериальным препаратам штаммов *K. pneumoniae* является актуальной, а научная новизна исследовательской работы А.А. Самойловой «Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*» несомненна. Результаты диссертационной работы, полученные при комплексных исследованиях, позволили разработать диагностические микрочиповые панели для выявления генетических детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации.

Связь диссертационной работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Самойловой Анны Андреевны выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и представляет собой решение актуальной научной задачи по разработке способа ускоренного определения генетических детерминант вирулентности и резистентности к антибактериальным препаратам штаммов *K. pneumoniae*.

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

Впервые разработана и апробирована диагностическая микрочиповая панель для выявления вирулентных штаммов *K. pneumoniae* и генетических детерминант резистентности на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации «АриаДНА». Обнаружена высокая генетическая гетерогенность штаммов *K. pneumoniae*: идентифицировано 17 капсульных типов и 18 сиквенс-типов. Установлено, что среди исследованных штаммов, выделенных от госпитализированных пациентов Санкт-Петербурга, 84,7 % изолятов обладали множественной лекарственной резистентностью. Устойчивость к карбапенемам проявляли 64,7 % изолятов, к колистину - 23,5 %. При оценке вирулентности изолятов *K. pneumoniae* на модели системной инфекции белых аутбредных мышей показано, что гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* (по результатам биопробы) принадлежали к капсульному типу K2, сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и
рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Для обработки результатов диссертационного исследования Самойловой А.А. применялись следующие методы вариационной статистики: угловое преобразование Фишера, критерий Вилсона, рангово-бисериальный коэффициент корреляции и точный тест Фишера. Методологическая и теоретическая база исследования актуальны, объем исследованных штаммов достаточен для достоверных результатов, которые были получены с помощью соответствующей статистической обработки данных. В работе исследовано 285 штаммов *K. pneumoniae*, которые были выделены из проб биологического материала (содержимого абсцесса, крови, желчи, мочи, отделяемого из брюшной полости, мокроты и др.) от

госпитализированных пациентов города Санкт-Петербурга. Дизайн работы соответствует целям и задачам исследования.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Выполненные исследования расширяют представление об особенностях биологических свойств бактерий *K. pneumoniae*, выделяемых из проб биологического материала у госпитализированных пациентов города Санкт-Петербурга с различной патологией.

Созданная модель оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* на основании точного теста Фишера с использованием программного пакета Microsoft Excel позволяет в автоматическом режиме рассчитывать значение коэффициента, на основании которого исследуемый штамм расценивается как вирулентный или авирулентный.

Разработанный способ ускоренного определения генетических детерминант вирулентности и резистентности к АМП у штаммов *K. pneumoniae* позволяет быстро выявлять вирулентные и антибиотикорезистентные бактерии.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования: изучении литературы по теме исследования, написании плана работы, постановке экспериментов, исследовании проб и выделенных штаммов, анализе полученных результатов, написании публикаций, баз данных, оформлении диссертации.

Оценка содержания диссертации и ее завершенность

Опубликованные работы и содержание автореферата полностью соответствуют основным положениям текста диссертационной работы.

Работа оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к рукописям диссертации. Структура диссертации состоит из следующих основных разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждения» представлены 4 главами собственных исследований, «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Перспективы дальнейшей разработки темы», «Список использованных источников». Объем диссертации – 137 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 18 рисунками, 18 таблицами. Библиографический список содержит 189 источников, из них – 20 ссылок на публикации отечественных авторов и 169 – иностранных авторов.

Во введении освещена актуальность исследования и степень разработанности темы, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту и данные об апробации работы.

В первой главе проведен обзор литературы отечественных и зарубежных исследователей по представленной теме: морфологические и биохимические свойства *K. pneumoniae*, вирулентность и антибиотикорезистентность исследуемого микроорганизма, а также клиническая значимость заболеваний, вызываемых данными штаммами. Обширно охарактеризованы методы выявления факторов вирулентности и генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам. Освещена важность точных диагностических маркеров идентификации гипервирулентных штаммов с целью обнаружения штаммов в микробиологических лабораториях.

Во второй главе описаны материалы и методы, используемые при выполнении исследований. Помимо классических бактериологических методов были применены: масс-спектрометрический метод идентификации микроорганизмов MALDI-TOF, полногеномное секвенирование штаммов *K. pneumoniae*, морфологические методы, использованы биологические модели *in vivo*.

В третьей главе дана оценка чувствительности изученных бактериальных штаммов к антибактериальным препаратам, определены генетические детерминанты резистентности и частота встречаемости хромосомных мутаций, связанных с резистентностью.

Выявлено, что 84,7 % штаммов проявляли множественную резистентность к антибиотикам. Установлено наличие генов карбапенемаз в 60,2 % штаммов и β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) в 57,7 % штаммов. Обнаружены мутации в изолятах *K. pneumoniae*, связанные с антибиотикорезистентностью: мутации в генах ДНКгиразы (*gyrA*) и топоизомеразы IV (*parC*), усечения и точечные мутации в генах *OmpK35* и *OmpK36*, а также мутации в генах *MgrB* или *PmrB*.

В четвертой главе дана характеристика генетических детерминант вирулентности и гипермукоидных свойств штаммов *K. pneumoniae*.

По результатам теста на гипермукоидность было выявлено 67,1 % штаммов с классическим фенотипом и 32,9 % штаммов с гипермукоидным фенотипом.

Идентифицированы капсульные типы гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*: K1 - 8,2 %, K2 - 24,7 %, K20 - 2,4 %, K57 - 10,6 %, K64 - 2,4 % изолятов. Остальные клинические изоляты относились к капсульным типам, которые ассоциируют с сКр (K3, K14, K15, K19, K23, K24, K39, K45, K62). Идентифицированы ST-типы, характерные для hvКр: ST23 (18,8 %), ST307 (7,0 %), ST86 (5,9 %), ST11 (1,2 %), ST65 (1,2 %). Остальные штаммы *K. pneumoniae* относились к ST-типам, которые ассоциируют с сКр.

Определена частота встречаемости факторов вирулентности *K. pneumoniae*: локус токсина колибактина - 10,6 % штаммов, локус сидерофора иерсиниабактина (*ybt*) - в 68,2 % штаммов, локусы *iro* и *iuc* были выявлены в 14,1 % и 72,9 % изолятов соответственно

В пятой главе проведена оценка вирулентности штаммов *K. pneumoniae* в модельных опытах на лабораторных животных (самки белых аутбредных мышей массой 19-22 г). Согласно полученным результатам изоляты были

разделены на три группы: авирулентные ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ) и гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ).

По результатам статистической обработки полученных данных наибольшая специфичность и чувствительность была выявлена для совокупности признаков серотипов K1 и K2, гена, кодирующего синтез сидерофора сальмохелина *iroB*, типов последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16* – 92,8 % и 100% соответственно.

В шестой главе описана разработка диагностических микрочиповых панелей для выявления генетических детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации.

Разработана модель, реализованная с помощью программного пакета Microsoft Excel для интерпретации результатов анализа проб ДНК с использованием диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты вирулентности.

Работа завершается заключением и 5-ю выводами, которые логически вытекают из результатов собственных исследований и обобщают весь объем информации. В заключении отражены перспективы дальнейших исследований и практические рекомендации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Результаты и практическая значимость выводов не вызывают сомнений, цели и задачи соответствуют требованиям.

Принципиальных замечаний к диссертационному исследованию нет. Работа отличается целостностью, соответствием содержания диссертации автореферату, опубликованным научным работам и паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты исследования отражены в 20 опубликованных научных работах, 5 из которых – в изданиях, входящих в международные базы данных, 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ и РУДН.

Заключение

Диссертация Самойловой Анны Андреевны «Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой, которая содержит новое решение научной задачи – разработки экспрессного способа оценки вирулентности и антибиотикорезистентности клинических штаммов *K. pneumoniae* на основе изучения генетических детерминант и фенотипических характеристик бактерий. Новые научные результаты, полученные диссертантом, имеют существенное значение для микробиологии.

Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., в том числе в диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, а её автор, Самойлова Анна Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Отзыв о научно-практической значимости диссертации Самойловой Анны Андреевны обсужден и одобрен на заседании кафедры микробиологии и вирусологии № 2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 9 от « 04 » марта 2025 г.