

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента, заместителя директора по инновационному развитию Федерального бюджетного учреждения науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Исаевой Гузель Шавхатовны на диссертационную работу Федотовой Ольги Семеновны «Микробиологические основы получения и использования комплексного бактериофага *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*», представленной на соискателя ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Одной из глобальных проблем медицины являются инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Особенно они актуальны для отделений реанимации и интенсивной терапии, которые считаются объектами высокого риска возникновения и распространения подобного рода инфекций. Всемирной организацией здравоохранения определены приоритеты научных исследований и разработок в области глобальной стратегии борьбы с устойчивостью к антимикробным препаратам. К микроорганизмам с критически высоким уровнем приоритетности отнесены *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, обусловленного их высоким потенциалом внутрибольничного распространения и колонизации поверхностей госпитальной среды, высокими уровнями резистентности к нескольким классам антибиотиков и высокими показателями летальности при инвазивных формах. По данным последних эпидемиологических исследований, среди причин развития сепсиса у пациентов, поступивших в реанимацию, доля грамотрицательной микрофлоры составляет до 75%, из них на *Pseudomonas aeruginosa* приходится 21%, *Klebsiella pneumoniae* – 20%, *Acinetobacter baumannii* 14-16,8% случаев. При этом необходимо принимать во внимание не только выраженную частота распространенности

гнойно-септических инфекций (ГСИ) в специализированных отделениях стационара, но и высокую степень устойчивости к антибиотикам, химиопрепаратам, дезинфектантам. Несмотря на достаточное количество работ, связанных с микробиологическими, эпидемиологическими и диагностическими исследованиями в отношении эффективности бактериофагов в качестве средств профилактики, лечения ГСИ, использования для внутривидовой идентификации полирезистентных штаммов надо отметить, что данных по применению подобных препаратов конкретно против *Acinetobacter baumannii* или комбинированных с *Pseudomonas aeruginosa* до сих пор не приводилось. В связи с этим, диссертационная работа Федотовой Ольги Семеновны «Микробиологические основы получения и использования комплексного бактериофага *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*» посвященная этим актуальным вопросам, является своевременной и оригинальной.

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

В результате проведенного Федотовой О.С. диссертационного исследования получены данные о циркуляции НГОБ в медицинских организациях Пермского края, где установлено, что чаще других в биологическом материале и на объектах внешней среды обнаруживали *P. aeruginosa* – 1135 (33,6%) и *A. baumannii* – 1041 (30,8%). Меньшую долю занимали *S. maltophilia* (13,2%). Удельный вес других представителей не превышал 7,9% – *A. lwoffii*, 4,1% – *A. junii*, 2,9% – *A. pittii*, 2,6% – *A. faecalis*, 2,4% – *P. alcaligenes*, 2,2% – *A. calcoaceticus*, 0,3% – *P. putida*. Диссертантом показано, что в структуре микрофлоры из биологических материалов от пациентов преобладали *A. baumannii*, из проб внешней среды – *P. aeruginosa*.

Диссертантом впервые выделен из биологического материала от пациентов и сточных вод многопрофильного стационара бактериофаг *Acinetobacter baumannii*. В результате проведенного полногеномного секвенирования линейный двухцепочечный ДНК-геном бактериофага

состоял из 41655 пар оснований (bp) нуклеотидных последовательностей, являлся представителем семейства *Autographiviridae* и характеризовался литическим циклом развития. Данные его внесены в базу GenBank № OL964948.

На его основе автор создал комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный, где вторым компонентом использует коммерческий препарат «Бактериофаг псевдомонас азругиноза (синегнойный)».

Впервые в исследовании автор разрабатывает метод оценки специфической активности комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный с изучением адгезивных свойств бактерий. Получен патент на изобретение РФ «Способ оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточных культур» RUS 2723188 от 09.06.2020г.

Важным результатом является то, что установлен высокий уровень чувствительности клинических штаммов *A.baumannii*, выделенных из отделений реанимации и интенсивной терапии, к комплексному бактериофагу, сопоставимый с уровнем чувствительности к антибиотику резерва (тигециклину) $83,0\% \pm 3,7\%$ ($\chi^2 = 0,06$, d.f. = 1, $p = 0,8$).

С использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный и оценки минимальной подавляющей концентрации к антибиотикам усовершенствован метод внутривидового типирования *P. aeruginosa*, получена микробиологическая панель для проведения идентификации распространенных сиквенс-типов (ST 208; ST 944; ST 1167) штаммов *A. baumannii*.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Федотовой О.С. обусловлена рациональным дизайном исследования, большим объемом фактического материала, использованием современных микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования, корректной статистической и биоинформационной обработкой данных.

Положения, выносимые на защиту, чётко аргументированы. Выводы научно обоснованы, подтверждены полученными экспериментальными данными и соответствуют содержанию работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационного исследования Федотовой О.С. состоит в том, что о распространенности и биологических свойствах *P. aeruginosa* и *A. baumannii* полученные в результате изучения в Пермском крае дополняют уже имеющие данные аналогичные сведения о антибиотикорезистентности и частотой встречаемости в других регионах Российской Федерации. Эти сведения позволяют в некоторой степени рассматривать актуальность разработки и создания новых эффективных антибактериальных препаратов.

Полученные данные о последовательности генома фага *A. baumannii* могут быть использованы для разработки более эффективных и принципиально новых препаратов, в том числе генно-модифицированных фагов обладающих преимуществами для диагностики и лечения бактериальных инфекций.

Практическая значимость диссертационной работы Федотовой О.С. заключается в том, предложенный автором набор диагностических тестов для внутривидовой дифференциации полирезистентных штаммов *A. baumannii* распространенных сиквенс-типов (ST 208; ST 944; ST 1167) позволяет провести эпидемиологическое расследование циркулирующих внутрибольничных штаммов в медицинских организациях и выявить между ними эпидемиологические связи.

Результаты исследования и проведения алгоритма внутривидового типирования штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* внедрены в практическую деятельность клиничко-диагностической лаборатории и в лекционный курс кафедры эпидемиологии и гигиены факультета дополнительного профессионального образования.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Полученные автором диссертации результаты доложены на 13 научно-практических конференциях и в достаточном объеме представлены в открытой печати: 5 статей в рецензируемых изданиях, 1 – в другом издании, 5 тезисов – в рецензируемых изданиях, 9 тезисов – в материалах конференций, получен 1 патент на изобретение РФ.

Оценка содержания, завершенности в оформлении диссертации

Структура диссертационной работы Федотовой О.С. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, 2 главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендации, проспектов дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, списка литературы включающего 223 источника, из которых – 83 отечественных, 140 – зарубежных авторов. Материалы диссертационной работы изложены на 143 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 29 таблицами и 18 рисунками.

В разделе «**Введение**» автор излагает актуальность темы исследования и степень её разработанности, формирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, личное участие в получении результатов, представляет положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов.

В первой главе «**Обзор литературы**», состоящей из четырёх подразделов, Федотова О.С. дает характеристику *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, приводит данные о частоте встречаемости и чувствительности к актуальным антибактериальным препаратам. Дает характеристику уже известным и охарактеризованным бактериофагам *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

Раздел «**Результаты собственных исследований**» включает две главы и начинается с характеристики региональных штаммов *A. baumannii* и *P.*

aeruginosa, представляет уровень их циркуляции в медицинских организациях. Автором установлено, что чаще других в клиническом материале и на объектах внешней среды обнаруживали *P.aeruginosa* – 1135 (33,6%) и *A. baumannii* – 1041 (30,8%). При этом автор определяет, что в структуре микрофлоры из биологических материалов от пациентов преобладал *A.baumannii* (38,2%), из проб внешней среды – *P. aeruginosa* (53,1%). Дальнейшие исследования были направлены на выделение из биологического материала от пациентов и объектов внешней среды бактериофагов *A.baumannii*, а также на формирование коллекции штаммов-продуцентов *A.baumannii* (n=190) с 2014 по 2020 гг., из разных медицинских организаций городов РФ. Диссертант описывает процесс получения комплексного препарата бактериофагов ацинетобактер-синегнойный. Дает характеристику комплексному бактериофагу, с показателем активности по методу Аппельмана для *A.baumannii* составил $10^{-4,93 \pm 0,12}$ и $10^{-5,97 \pm 0,09}$ *P.aeruginosa*. Автор разрабатывает новый способ оценки специфической активности комплексного бактериофага с использованием клеточной культуры ЛЭЧ-3, показывает эффективность препарата наряду с коммерческим препаратом «Бактериофаг Стафилококковый®». При сравнительной оценке чувствительности штаммов *A. baumannii* к антибиотикам и комплексному бактериофагу (2014-2020 гг.) показывает эффективность использования фаготерапии в отделении реанимации и интенсивной терапии, где чувствительность микроорганизмов к бактериофагу составила $81,0 \pm 5,4\%$ и была сопоставима с антибиотиком резерва тигециклином $83\% \pm 3,7\%$ ($\chi^2=0,06$, d.f.=1, p=0,8).

Третья глава посвящена усовершенствованию методов внутривидового типирования полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii* с использованием разработанного бактериофага ацинетобактер-синегнойный. На примере 53 штаммов *P. aeruginosa*, выделенные из разных очагов ГСИ, имели существенные отличия в МПК, достигающие 1024 раз. Для проведения внутривидового типирования *A. baumannii* из четырех

многопрофильных медицинских учреждений (А, В, С и Д) были отобраны 74 полирезистентных штамма. Проведено мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) 15 изолятов *A. baumannii*, 6 из них депонированы в Pub MLST, что позволит проводить сопоставление госпитальных изолятов не только на территории РФ, но и за рубежом. Дальнейшая работа автора, была посвящена характеристике фенотипических свойств штаммов *A. baumannii* разных сиквенс-типов. Диссертантом были также использованы приемы пространственной микробиологии с характеристикой штаммов, выделенных из различных источников и в различные временные интервалы. В результате был сформирован оригинальный набор дифференцирующих тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности трех сиквенс-типов *A. baumannii* (ST 1167, ST 944 и ST 208) по фенотипическим признакам.

В разделе «**Заключение**» автор анализирует и сопоставляет с данными литературы полученные результаты, которые показывают потенциальную возможность широкого применения комплексного бактериофага с лечебно-профилактической целью в структурных подразделениях высокого риска развития гнойно-септических инфекций. Диссертант разрабатывает и показывает эффективность использования доступных фенотипических дифференцирующих тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности полирезистентных штаммов *A. baumannii* распространенных сиквенс типов ST 208, ST 944 и ST 1167.

Выводы диссертационной работы достоверны, убедительны, соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат диссертационного исследования Федотовой О.С. отражает содержание, результаты работы и выводы в необходимом объеме, полностью соответствует тексту диссертации, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами. Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям ГОСТ 7.0.11.-.2011.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, основным положениям и выводам, сформулированным автором, диссертация полностью соответствует специальности 1.5.11.– микробиология (биологические науки).

Необходимо отметить, что диссертационная работа О.С. Федотовой выполнена на высоком методическом уровне с привлечением целого арсенала современных методов микробиологии, молекулярной биологии, электронной микроскопии и биоинформатики, однако хотелось бы высказать некоторые замечания и пожелания. Принципиальных замечаний по диссертации нет. В рукописи имеются стилистические ошибки и опечатки, которые не снижают научной и практической ценности диссертации.

Замечания и вопросы:

1. В подразделе 2.3.2. «Генотипическая характеристика штаммов - продуцентов» диссертантом представлены результаты тестирования на наличие генов антибиотикорезистентности, кодирующих продукцию карбапенемаз, а также описаны морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и литические свойства штаммов бактерий - продуцентов бактериофага *Acinetobacter baumannii*. Данное название подраздела не полностью отражает результаты изучения не только генотипических, но и фенотипических свойств штаммов-продуцентов. В работе было бы полезным включить данные изучения фенотипического проявления антибиотикорезистентности к карбапенемам у штаммов-продуцентов бактериофага *A. baumannii*, которые могут отражать другие молекулярные механизмы резистентности, например механизм эффлюкса.

Вопрос: Чем был обусловлен выбор изучения генов, ответственных за синтез карбапенемаз, для генотипической характеристики бактерий-продуцентов?

2. Несомненным достоинством практической значимости диссертационной работы является создание рабочей коллекции бактерий-продуцентов ацинетобактерного бактериофага, состоящей из 190

высококочувствительных штаммов. Но в работе отсутствует описание методов длительного сохранения и субкультивирования штаммов, а также их депонирования.

Вопрос: Какие методы были использованы диссертантом для консервации и субкультивирования коллекционных штаммов *A. baumannii* ?

3. Специфичность действия комплексного бактериофага проводилась в отношении штаммов *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и микроорганизмов – представителей различных неродственных видов и семейств (стафилококки, стрептококки, протей, эшерихии, клебсиеллы, шигеллы, сальмонеллы). При этом в работе желательно было провести тестирование специфичности действия на других близкородственных видах родов *Acinetobacter* и *Pseudomonas*.

Вопрос: Чем был обусловлен именно такой выбор спектра тестируемых культур для изучения специфичности разработанного комплексного бактериофага?

Однако следует отметить, что указанные выше замечания не принципиальны и не снижают высокого уровня диссертационной работы О.С. Федотовой, которая является самостоятельным законченным научным исследованием, результаты которого имеют как теоретическую, так и практическую ценность.

Заключение

Диссертационная работа Федотовой Ольги Семеновны на тему «Микробиологические основы получения и использования комплексного бактериофага *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки), выполненная под руководством доктора медицинских наук, доцента Захаровой Юлии Александровны, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной

научной проблемы, имеющей важное значение – разработан комплексный препарат бактериофагов ацинетобактер-синегнойный с оценкой возможности его использования для внутривидового типирования полирезистентных штаммов микроорганизмов *A.baumannii* и *P. aeruginosa*.

Диссертационная работа Федотовой Ольги Семеновны актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, № 426 от 20.03.2021, № 1539 от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Федотова Ольга Семеновна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология (биологические науки).

Заместитель директора по инновационному развитию Федерального бюджетного учреждения науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (420015, г. Казань, ул. Большая Красная, д.67, телефон (843)236-67-81, факс (843)236-67-41, e-mail: kniem@mail.ru)

доктор медицинских наук, доцент  Гузель Шавхатовна Исаева

Подпись Гузель Шавхатовны Исаевой заверяю:

ученый секретарь, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии и разработки аллергенов Федерального бюджетного учреждения науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (420015, г. Казань, ул. Большая Красная, д.67, телефон (843)236-99-79, факс (843)236-67-41, e-mail: kuliks@yandex.ru)

кандидат биологических наук  Куликов Сергей Николаевич

27.04.2022г.

