

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, заведующего лабораторией вирусов микроорганизмов Института микробиологии имени С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук Андрея Викторовича Летарова на диссертационную работу Федотовой Ольги Семеновны «Микробиологические основы получения и использования комплексного бактериофага *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – микробиология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационного исследования

Биология бактериофагов занимает особое место в истории микробиологической науки. Исследования в этой области знаний привели в XX веке к достаточно универсальному и безопасному способу этиотропной терапии бактериальных инфекций и первой технологии высокоразрабатываемого типирования штаммов бактерий. В настоящее время исследования бактериофагов перестали быть результатом усилий относительно небольшого числа микробиологов, вирусологов и генетиков и превратились в одно из важнейших направлений биологической науки и практики. Фаговая терапия вновь рассматривается, как одно из возможных решений кризиса, связанного с распространением резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Основопологающим принципом классической фаговой терапии является противопоставление адаптационному потенциалу патогенных бактерий эволюционного потенциала бактериофагов путем непрерывного выделения, характеристики и введения в практику новых природных изолятов бактериофагов, которые обладают литической активностью против актуальных штаммов тех или иных видов патогенных бактерий. И хотя были предложены альтернативные подходы, основанные на инженерии хозяйской специфичности немногочисленных фагов-платформ, почти все реально применяемые фаговые композиции (включая экспериментальную терапию) основаны на использовании природного разнообразия бактериофагов. В этой связи во всем мире осуществляется большое число работ по описанию и исследованию новых штаммов вирусов бактерий, потенциально пригодных для фаговой терапии. Диссертационная работа О.С. Федотовой направленная на получение комплексного препарата бактериофага ацинетобактер-синегнойный с высокой литической активностью в отношении актуальных клинических штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* и изучение основных морфологических и физиологических свойств фага выполнена именно в данном ключе, и поэтому обладает определенной актуальностью.

Фаговое типирование бактерий, хотя и имеет существенную историю, в настоящее время в основном уступило место более производительным и быстрым молекулярным методам. Поэтому с моей точки зрения, предложенное использование бактериофага *A. baumannii* в качестве диагностического инструмента хотя и является возможным, вряд ли будет иметь существенное практическое значение.

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

В результате проведенного исследования для обоснования разработки комплексного препарата бактериофага *A. baumannii* и *P. aeruginosa* автором получены новые знания о распространенности и резистентности неферментирующих грамотрицательных бактерий в медицинских учреждениях крупного промышленного центра, их частоте встречаемости среди пациентов и во внешней среде стационаров. Изучено влияние на циркуляцию клинических изолятов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* абиотических и биотических факторов (плотность и характер распространения в различных подразделениях стационаров), их антибиотикочувствительность.

Автором в 2014 году выделен и охарактеризован бактериофаг *Acinetobacter baumannii*. По результатам проведенного полногеномного секвенирования линейный двухцепочечный ДНК-геном бактериофага, является представителем литического фага, относящегося к виду *Acinetobacter virus AS11*, роду *Friunavirus*, подсемейству *Beijerinckvirinae*, семейству *Autographiviridae*, порядку *Caudovirales*. Нуклеотидная последовательность фага в 2021 году депонирована в базу данных GenBank с регистрационным номером OL964948.

Необходимо отметить, однако, что данный бактериофаг отличается лишь единичными SNP от ранее опубликованного фага vB_AbaP_AS11.

Автор впервые исследовал основные морфологические и физиологические характеристики полученного бактериофага (константу адсорбции, основные фазы внутриклеточного развития, литическую и специфическую активность, диапазон действия и др.). На основе детально охарактеризованного бактериофага *A. baumannii* был сконструирован комплексный препарат – бактериофаг ацинетобактер-синегнойный, установлена высокая литическая активность полученного экспериментального образца бактериофага, относительно коллекции полирезистентных штаммы *A. baumannii*, выделенных из отделений реанимации и интенсивной терапии – фаг лизировал 83% этих изолятов. Впервые апробирован новый экспресс-способ, позволяющий на уникальной биологической модели - культуре эмбриональных клеток человека ЛЭЧ-3 определить не только специфическую активность фага, но и важный показатель паразитизма микроорганизмов, степень адгезии (индекс адгезии и процент пораженных клеток). На разработанный способ автором получен

патент РФ на изобретение «Способ оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточных культур» RU 2723188 от 09.06.2020г. Представленные в работе данные свидетельствуют о высоком потенциале и научно-практической ценности использования клеточных культур человека для проведения таких исследований.

Впервые комплексный бактериофаг неферментирующих грамотрицательных бактерий использован как внутривидовой маркер, позволяющий дифференцировать бактериальные штаммы не только на фенотипическом, но и на генотипическом уровне, поскольку фаг проявил специфическую активность к определенному сиквенс-типу *A. baumannii* (ST-1167). В связи с этим отмечу, что в представленном исследовании на молекулярном уровне установлен факт специфической направленности фага *A. baumannii* против отдельного генетического варианта, что в будущем, открывает новые возможности для создания перспективной линейки бактериофагов, лизирующих определенные генотипы бактерий с целью внутривидовой идентификации и персонализированной терапии. Автор на примере *P. aeruginosa* впервые применил метод серийных разведений антибиотиков в комплексе с бактериофагом для изучения экологии микробных сообществ и особенностей циркуляции отдельных микробных популяций в искусственно созданной экосистеме стационара, благодаря чему определил пространственные и временные границы очагов внутрибольничных инфекций. Таким образом, результаты диссертационной работы Федотовой О.С. могут дать старт новому перспективному направлению фагодиагностики – внутривидовой идентификации микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью и их наиболее распространенных внутрибольничных генетических вариантов.

В ходе работы в международную базу данных Pub MLST депонированы 6 сиквенс-типов (ST) *A. baumannii*. Отдельно отмечу уникальный генетический сиквенс-тип *A. baumannii* – ST 1167, поскольку он встречается только на территории РФ, в базе данных имеется информация лишь о 13-ти нуклеотидных последовательностях его представителей.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Федотовой О.С. обусловлена использованием современных микробиологических (исследование штаммов микроорганизмов и бактериофагов) и молекулярно-генетических (фрагментарное и полногеномное секвенирование) методов, корректной статистической и биоинформационной обработкой данных и большим объемом фактического материала.

Положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы научно обоснованы, подтверждены экспериментальными данными, соответствуют содержанию работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Выполненный в работе полномасштабный количественный и качественный анализ циркуляции неферментирующих грамотрицательных бактерий в медицинских учреждениях крупного промышленного центра и созданная на их основе уникальная коллекция штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* открывает новые возможности для оценки мест их обитания, позволяет изучить проблемы эволюции и основы жизнедеятельности бактерий и их бактериофагов в условиях искусственно-созданной экологической системы. Новые данные о распространенности устойчивых к антибиотикам штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, будут способствовать совершенствованию антибактериальной терапии и ликвидации эпидемических очагов инфекций. Данные о сиквенс-типах *A. baumannii* формируют представления о клональной структуре нозокомиальных штаммов микроорганизмов и их генетической гетерогенности, а также обосновывают необходимость определения молекулярно-генетической природы лекарственной устойчивости.

Использование новой биологической модели – клеточной культуры ЛЭЧ-3 для изучения на ее основе механизмов взаимодействия, микробной клетки в присутствии бактериофага с живыми тканями (клетками) человека, в т.ч. адгезивных свойств бактерий, позволило описать интересное явление ингибирования бактериофагами адгезии бактериальных клеток. При этом условия эксперимента, описанные в диссертации, позволяют предположить, что непосредственно литическое действие бактериофага не успело проявиться в существенной степени. Хотя автор почему-то не стал продолжать эксперименты в данном направлении, полученный результат при его надлежащем развитии, может привести к описанию новых и необычных явлений, характеризующих взаимодействия в тройственной системе бактерия-бактериофаг-ткань макроорганизма.

Значимым практическим результатом работы является установленные автором высокий уровень чувствительности штаммов *A. baumannii*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии, к комплексному бактериофагу, сопоставимый с уровнем чувствительности к антибиотикам резерва (тигециклину), что, создает предпосылки для использования метода фаговой терапии и выделенного автором бактериофага для лечения инфекций, вызванных данным возбудителем.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

По теме диссертации Федотовой О.С. опубликовано 5 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также представлены 5

тезисов – в рецензируемых изданиях, 9 тезисов – в материалах конференций, получен 1 патент на изобретение РФ.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Автором лично сформулированы цель и задачи исследования, разработан дизайн, проведена значительная часть лабораторных исследований, выполнена обработка результатов анкетирования пациентов и в целом статистическая обработка данных.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, включает введение, главу обзора литературных данных, две главы собственных исследований, заключение, выводы, разделы практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, а также список сокращений и список цитируемой литературы. Общий объем диссертации, включая 18 рисунков и 29 таблиц, составляет 143 страницы, в том числе список литературы состоит из 223 источников.

Во введении дана общая характеристика работы, сформулированы цели и задачи исследования.

Первая глава освещает вопросы биологической характеристики *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, частоты их встречаемости на отдельных территориях Российской Федерации и за рубежом, профиле чувствительности к антимикробным препаратам. Представлен обзор о бактериофагах, их жизненном цикле и применении в диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней человека

Во второй главе автор проводит анализ распространенности *A. baumannii* и *P. aeruginosa* в медицинских организациях Пермского края, данные о чувствительности клинических изолятов к антимикробным препаратам. Известно, что бактериофаги чаще всего изолируют из сточных вод с использованием выделенного в клинике бактериального штамма. Автор тем же путем получает из биологического материала от пациентов и из сточных вод бактериофаг *A. baumannii*, проводит отбор перспективных клинических изолятов и формирует коллекцию из 190 штаммов бактерий-продуцентов бактериофага. В последующем, характеризует основные морфологические и физиологические свойства ацинетобактерного бактериофага, приводит результаты экспериментальных данных о повышении литической активности бактериофага путем адаптации слабочувствительных бактерий. Описывает процесс получения комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный. Приводит подробные данные о параметрах инфекционного процесса с участием бактериофага ацинетобактер-синегнойный, показателях его литической активности и диапазоне действия.

При изучении литической активности комплексного бактериофага автор предлагает новый способ ее оценки с использованием клеточной культуры ЛЭЧ-3. В качестве подтверждения эффективности разработанного препарата приводит данные результатов высокой чувствительности клинических изолятов *A. baumannii* к антибиотикам и комплексному бактериофагу в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Данные получены в медицинских организациях двух крупных промышленных городов с миллионным населением в различные временные периоды наблюдений (с 2014 по 2020 гг.).

Третья глава посвящена совершенствованию методов внутривидового типирования полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii* с использованием разработанного бактериофага ацинетобактер-синегнойный. Именно этот процесс стал центром научных интересов автора в представленном разделе. Автор демонстрирует, что метод серийных разведений антибиотиков в комплексе с бактериофагом является внутривидовым маркером при сопоставлении бактериальных изолятов. Федотова О.С. разрабатывает новую диагностическую панель, состоящую из доступных фенотипических дифференцирующих тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности трех наиболее распространенных на территории Пермского края и Свердловской области сиксенс-типов полирезистентных штаммов *A. baumannii*, включая редко встречаемый в мире сиквенс-тип ST 1167.

Выводы обоснованы и подтверждаются полученными результатами. Практические рекомендации четко сформулированы и представляют определенный интерес для практического здравоохранения.

Автореферат отражает содержание рукописи диссертации, полностью соответствует ее тексту, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами.

Обобщая сказанное, можно отметить, что представленная работа является описательным исследованием, выполненным в целом корректно, обладающим достаточной новизной. По постановке задач и их решению работа является достаточно стандартной. Намечающийся интересный результат, связанный с воздействием фагового препарата на адгезионные свойства бактерий, не получил никакого развития, автором не сделано попыток (во всяком случае, они не отражены в диссертации) разобраться в механизмах явления.

Соответствие специальности

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

Принципиальных замечаний по представленной работе нет.

Вызывает сожаление, что автор не стал развивать работу по изучению механизмов стоящих за ингибированием адгезии бактерий фаговыми препаратами. Нет оценки, в какой степени этот эффект вызван именно бактерицидным действием фага. В качестве контролей было разумно использовать не только вариант без бактериофага, но и вариант с гетерологичным фагом, не инфицирующим данный вид возбудителя.

Однако, в рукописи диссертации и автореферата имеются стилистические ошибки, опечатки, есть некоторые замечания, привожу их ниже:

1. На рис. 12 (А) есть трудности с визуализацией отличий микроорганизмов *A. baumannii* при иллюстрации процента пораженных клеток и процента адгезировавшихся клеток;
2. В GenBank депонирован бактериофаг OL964948 под аббревиатурой *Acinetobacter_phage_vB_AbaP_PE21*, в диссертационной работе указан *Acinetobacter_phage_vB_AbaP_PE14*;
3. На стр. 12 в первом столбце таблицы 1 отсутствует нумерация некоторых позиций;
4. На стр. 15 указано «в лабораториях медицинских организациях» вместо «организаций»;
5. На стр. 35 «в жидкой среде дает помутнее...», вместо «помутнение».
6. В «Заключении» на стр. 107 при описании методик для проведения внутривидовой идентификации полирезистентных штаммов микроорганизмов, идет ссылка на источники, не соответствующие данному разделу;
7. В тесте диссертации отсутствует ссылка на литературный источник 99;
8. В автореферате несоответствие общей нумерации таблиц, на стр. 20 таблица 3 (правильно таблица 4).

Представленная работа является описательным исследованием, выполненным в целом корректно, обладающим достаточной новизной, но при этом лишенным особой научной оригинальности. По поставке задач и решению работа является достаточно стандартной. Намечающийся интересный результат, связанный с воздействием фагового препарата на адгезионные свойства бактерий, не получил никакого развития, автором не сделано попыток (во всяком случае, они не отражены в диссертации) разобраться в механизмах явлениях

Указанные недостатки, не являются принципиальными, поскольку в целом не снижают положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

Подводя итог, отмечу, что несмотря на сделанные замечания, 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), является завершённой научно-квалификационной работой, которая по своей 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 Российской Федерации № 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, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020), 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).

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского
Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук
(117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2
Тел.: +7 (499) 135-72-64, e-mail: letarov@gmail.com)

доктор биологических наук

Андрей Викторович Летаров

26.04.2022

Подпись А.В. Летарова заверяю:

Ученый секретарь

Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук
(119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
Телефон +7(495)954-40-07, e-mail: orlovsky@inbi.ras.ru)

кандидат биологических наук

Александр Федорович Орловский

