

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, заведующего лабораторией молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский Университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Чеботаря Игоря Викторовича на диссертационную работу Ганиной Екатерины Борисовны на тему: «Характеристика биологических свойств *Staphylococcus aureus*, выделенных от здоровых школьников Тверской области», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Инфекции, вызываемые золотистым стафилококком, являются актуальной медицинской проблемой для человечества в глобальном масштабе. Золотистые стафилококки принадлежат к лидирующей группе бактерий-оппортунистов ESKAPE и занимают одно из первых мест среди возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, которые характеризуются различными симптомами и локализацией. Особенно важной проблема инфекций, ассоциированных с *Staphylococcus aureus*, стала во время эпидемии COVID-19: золотистый стафилококк является одним из ведущих оппортунистических патогенов, вызывая от 13,5 до 31,6% вторичных инфекций при COVID-19.

Естественной экологической нишей золотистых стафилококков являются слизистые оболочки и кожа человека и животных. Опасность «здорового носительства» заключается в возможности трансформации *S. aureus* из комменсальной формы, которая не наносит ущерба хозяину, в патогенетически агрессивную форму, способную вызывать многоликую патологию (гнойно-воспалительные процессы, системные интоксикации, включая развитие шока) различной степени тяжести. Агрессия со стороны стафилококков возможна как в отношении носителя персистентной формы, так и в отношении других лиц. Обычно это происходит при изменении

внутренних параметров локуса персистенции *S. aureus* или при смене организма-хозяина. Таким образом, стафилококковое носительство имеет не только клиническое, но и эпидемиологическое значение, так как бактерионосители (представители всех возрастов и социальных групп) являются скрытыми источниками инфекции. Согласно данным многочисленных исследований, в последние годы частота встречаемости *S. aureus* среди детей 7–11 лет перманентно растет. Это ставит перед научно-медицинским сообществом ряд вопросов, касающихся оценки биологических характеристик стафилококков, циркулирующих в детской популяции.

Вышеизложенное подтверждает, что диссертационная работа Ганиной Екатерины Борисовны, посвящённая исследованию свойств штаммов *S. aureus* (антагонистическая активность, устойчивость к антибактериальным препаратам, наличие факторов патогенности, степень адгезии, спектр газовых сигнальных молекул), изолированных от здоровых детей 7–11 лет, проживающих в Тверской области, является актуальной и своевременной.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе Ганиной Е.Б. были получены сведения о микробиоте (видовой состав, частота встречаемости и количественные показатели) верхних дыхательных путей здоровых школьников 7–11 лет, проживающих в Тверской области. Автор обнаружила чрезвычайно высокий процент носительства золотистого стафилококка среди здоровых детей школьного возраста. В городе Твери процент носительства в носовой полости составлял 45 %, в зеве - 55 %. В городе Торжок показатели носительства золотистого стафилококка у детей в носовой полости были еще выше и достигали 80 %. Выявлено, что все изолированные от детей штаммы *S. aureus*, имели спектр вирулентных свойств, достаточных для потенциальной реализации стафилококковой инфекции. Эти данные могут быть полезны для практического здравоохранения при оценке причин

возникновения гнойно-воспалительных заболеваний полости рта и носоглотки, а также при планировании рациональной антибактериальной терапии.

Диссертантом впервые в эксперименте на белых крысах была воспроизведена модель бактериального стоматита (на базе травматического стоматита) в результате воздействия штамма *S. aureus*, выделенного со слизистой зева здорового школьника г. Твери. В динамике впервые описана микробиологическая и гистологическая картина развития экспериментального травматического, а также стафилококкового стоматита у лабораторных животных. Охарактеризованы подробно спектр, распространённость и количество микробиоты слизистой оболочки полости рта здоровых крыс и животных, больных травматическим или бактериальным стоматитом, в течение и после завершения лечения стоматита высокоактивными культурами лактобацилл (*L. fermentum*, *L. rhamnosus*), которые продемонстрировали высокий пробиотический потенциал и антагонистическую активность в отношении *S. aureus*.

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

Достоверность данных полученных в результате диссертационного исследования Ганиной Е.Б. подтверждается большим объёмом фактического материала - со слизистой оболочки верхних дыхательных путей 96 школьников изолировано и идентифицировано 523 штамма микроорганизмов, из них 112 изолятов принадлежали к виду *S. aureus*. Все результаты были получены на основе использования микробиологических, гистологических и статистических методов исследования. В работе использовали сертифицированное оборудование и пакет официальных прикладных компьютерных программ.

Положения, выводы и практические рекомендации, представленные в диссертации, обоснованы, подтверждены экспериментальными данными и

соответствуют содержанию работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость работы заключается в получении автором новых сведений о микробиоте верхних дыхательных путей (спектр, частота встречаемости и количество) практически здоровых школьников от 7 до 11 лет, проживающих в Тверской области. Особого внимания заслуживают новые данные, полученные Ганиной Е.Б. в результате исследований, о наличии патогенных свойств и частоте выявления *S. aureus* в составе микробиоценоза верхних дыхательных путей (полость носа и зев) у здоровых школьников. Подобные исследования дополняют сведения, имеющиеся по другим регионам РФ, и в совокупности дают необходимую информацию об общем уровне здоровья детей Российской Федерации. Эти данные также могут быть использованы с целью расширения знаний о причинах возникновения и течении гнойно-воспалительных заболеваний ротовой полости и верхних дыхательных путей.

Практическая значимость работы состоит в том, что впервые для изучения биологических свойств *S. aureus* диссертантом была создана в эксперименте на белых крысах оригинальная модель бактериального стоматита, вызванного штаммом золотистого стафилококка, изолированного от здорового ребёнка. Модель стафилококкового стоматита позволила доказать целесообразность коррекции данного заболевания культурами *Lactobacillus*, которые обладают высоким пробиотическим потенциалом и антагонистической активностью, воздействуя на *S. aureus* как причину развития бактериального стоматита. Штаммы лактобацилл (*L. fermentum*, *L. rhamnosus*) были изолированы из полости рта здоровых людей и могут быть рассмотрены в качестве кандидатов на включение в состав современных пробиотических препаратов, применяемых для профилактики и лечения инфекционных заболеваний ротовой полости и носоглотки.

Результаты диссертационного исследования Ганиной Е.Б. легли в основу зарегистрированных баз данных:

1) *«Микроорганизмы, выделенные из полости рта здоровых крыс и больных бактериальным стоматитом на различных этапах лечения»* (№2018620494, от 27 марта 2018 г.); 2) *«Газовые сигнальные молекулы, выделенные лактобациллами и стафилококками от здоровых детей разных возрастных групп»* (№2020620656, от 09 апреля 2020 г.); 3) *«Чувствительность к антибиотикам стафилококков, выделенных из различных биотопов здоровых детей»* (№2020620654, от 9 апреля 2020 г.).

Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс кафедр ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинской университет» Минздрава РФ и ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава РФ.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на 11 всероссийских и международных конференциях. По материалам исследования автором опубликована 21 печатная работа, в том числе 6 статей в рецензируемых изданиях, 4 тезисов — в рецензируемых изданиях, 11 тезисов — в материалах конференций, зарегистрировано 3 Базы данных.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация Ганиной Екатерины Борисовны построена по традиционному плану и состоит из Введения, Обзора литературы, 2 глав Результаты собственных исследований, Обсуждения результатов и заключения, Выводов, Практических рекомендаций, Перспектив дальнейшей разработки темы, Списка сокращений и литературы, Приложения, Благодарности. Материалы диссертационной работы изложены на 136 страницах компьютерного текста и иллюстрированы 16 рисунками и 13

таблицами. Список литературы содержит 201 источник, из них 134 отечественных и 67 зарубежных.

Во **Введении** автор излагает актуальность темы исследования и степень её разработанности, формулирует цель и задачи исследования, обобщает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, описывает методологию и методы собственных исследований, положения, выносимые на защиту, личный вклад в выполнение исследования.

В главе «**Обзор литературы**», состоящем из трёх подразделов, Ганина Е.Б. описывает «здоровое» носительство *S. aureus* и его опасность для организма-хозяина, даёт представление о заболеваниях, вызываемых стафилококковой инфекцией. В ретроспективном статистическом аспекте охарактеризована частота выявления *S. aureus* среди населения РФ, принадлежащего к разным возрастным и социальным группам. Показаны свойства патогенности и защиты, способствующие колонизации и персистенции *S. aureus*. Раздел написан полно, данные литературы использованы при обсуждении результатов исследования.

Раздел «**Результаты собственных исследований**» включает две главы и начинается с характеристики микробиоты верхних дыхательных путей (нос и зев) 96 практически здоровых школьников от 7 до 11 лет. Среди выделенных микроорганизмов 112 штаммов идентифицировано как *S. aureus*. Особое внимание было уделено изучению биологических свойств 31 штамма *S. aureus*, наиболее активно проявивших патогенные свойства. Диссертантом описаны результаты исследования антагонистической активности *S. aureus* к тестовым культурам (*S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* Typhimurium 415, *Shigella sonnei* I фазы 941, *Bacillus subtilis* 534) – чаще проявляли среднюю степень антагонизма. Была изучена ферментативная активность выделенных образцов *S. aureus* и чувствительность к 11 видам антибиотиков.

Установлено, что штаммы *S. aureus*, изолированные от тверских детей показали наличие лецитиназной и коагулазной активности, 100 % резистентность к гентамицину и рифампицину; штаммы, выделенные от школьников г. Торжка, обладали лецитиназной, коагулазной, гемолитической и казеинолитической активностями, 100 % устойчивостью к рифампицину. Автором изучена способность *S. aureus* к адгезии (на клетках многослойного плоского эпителия слизистой оболочки полости рта человека) и продукция газовых сигнальных молекул (H_2 , O_2 , N_2 , CO , CH_4 , CO_2 , NO , H_2S), выделяемых *S. aureus*.

С целью моделирования стафилококкового стоматита в эксперименте на лабораторных крысах из 31 штамма *S. aureus* был отобран один (выделен со слизистой оболочки зева клинически здорового школьника г. Твери), имеющий наиболее широкий спектр факторов патогенности.

Вторая глава посвящена разносторонней оценке экспериментального стоматита (травматического и бактериального) у крыс, а также коррекции данного заболевания культурами лактобацилл с высоким пробиотическим потенциалом. Моделирование травматического стоматита, потом на его основе стафилококкового стоматита, а затем коррекция заболевания в эксперименте на лабораторных животных пробиотическими культурами лактобацилл дали возможность проследить в динамике изменения спектра и количества микроорганизмов, выяснить особенности морфологии слизистой десны крыс. Доказано микробиологическими и гистологическими методами, что штамм *S. aureus*, изолированный от здорового ребёнка, спровоцировал развитие бактериального стоматита в эксперименте на белых крысах, также подтверждена целесообразность дополнения лечения данного заболевания у животных высокоактивными культурами *Lactobacillus*.

В разделе «Обсуждение результатов и заключение» Ганиной Е.Б. осуществляется подробный сравнительный анализ результатов диссертационного исследования с данными литературы. Автором

обобщаются новые сведения, отражающие новизну работы: в эксперименте установлена потенциальная опасность штаммов *S. aureus*, изолированных от здоровых бактерионосителей, показана эффективность применения пробиотических штаммов *L. fermentum* и *L. rhamnosus* с целью лечения экспериментального бактериального стоматита, вызванного *S. aureus*.

Выводы содержат ответы на все поставленные задачи, аргументированы, подтверждены достоверными данными, полученными в процессе диссертационного исследования, логическим завершением которого они являются.

Автореферат диссертационного исследования Ганиной Е.Б. 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).

У оппонента имеется несколько замечаний, касающихся оформления диссертации. В частности, смысл фразы, который в тексте диссертации подтверждается ссылкой на литературный источник 68 (раздел 1.7 на стр. 17), не соответствует содержанию источника 68 в списке литературы. Непонятна методика оценки чувствительности к антимикробным препаратам выделенных в ходе исследования бактерий, так как автор указывает два источника критериев интерпретации - Институт клинических и лабораторных стандартов США и EUCAST. Имеются ошибки в названиях наборов для биохимической идентификации бактерий производства BioMérieux.

Однако перечисленные замечания не являются принципиальными и не снижают значимости диссертации.

Во время ознакомления с диссертационной работой Ганиной Е.Б. у оппонента возникло несколько вопросов:

1. В соответствии с какими критериями бактерии включали в группу представителей нормальной микрофлоры?
2. Какие критерии оценки чувствительности стафилококков к антимикробным препаратам использовались в работе?
3. Насколько целесообразным было использование эритрит агара в процессе изучения нормофлоры носовой полости и зева у детей?
4. Было ли зарегистрировано носительство на слизистых носовой полости и зева детей других потенциально опасных оппортунистических патогенов?

Заключение

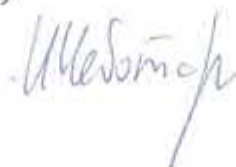
Диссертационная работа Ганиной Екатерины Борисовны на тему: «Характеристика биологических свойств *Staphylococcus aureus*, выделенных от здоровых школьников Тверской области», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (биологические науки), выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Червинец Юлии Вячеславовны, и доктора медицинских наук, доцента Шестаковой Валерии Геннадьевны, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи – охарактеризовать биологические свойства *S. aureus*, изолированных от клинически здоровых школьников 7–11 лет, проживающих в Тверской области, определить потенциальную способность золотистого стафилококка вызвать бактериальный стоматит в эксперименте на белых крысах и оценить целесообразность коррекции данного заболевания культурами *L. fermentum* и *L. rhamnosus*.

По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Ганиной Екатерины Борисовны отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021 г., с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, Ганина Екатерина Борисовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский Университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, +7 (495) 434-14-22, uchsovvet@rsmu.ru)

доктор медицинских наук



Чеботарь Игорь Викторович

15.11.2021

Подпись И.В. Чеботаря заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский Университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, +7 (495) 434-14-22, uchsovvet@rsmu.ru)

кандидат медицинских наук, доцент



Демина Ольга Михайловна

