

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича на диссертационную работу Катаевой Любови Владимировны «Микробиологические аспекты микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 03.02.11 – паразитология

Актуальность темы исследования

Сложный характер закономерностей паразитоценотических взаимосвязей при смешанной инвазии и инфекции обусловлен непосредственным взаимодействием возбудителей и опосредованным через организм общего хозяина. В понятие «паразитоценоз» включается совокупность организмов, населяющих организм одного хозяина. Вместе с хозяином он определяет уровень и характер отношений – «хозяин - паразит». Течение сочетанных паразитарных и бактериальных инфекций-инвазий, как правило, отягощающее, но совокупность возбудителей болезней не всегда наносит организму больший ущерб, чем каждый из них в отдельности. Между отдельными членами паразитоценоза существуют антагонистические отношения, сдерживающие рост и уменьшающие период существования тех или иных популяций. Чрезвычайно малая разработанность взаимовлияния сочленов паразитоценозов обуславливает необходимость планомерных исследований в этом направлении. Изменения нормофлоры в структуре микробиоценоза толстой кишки, отягощающая роль отдельных групп условно-патогенных микроорганизмов, их значение в патогенезе паразитарных инвазий не определены, вместе с тем эти сведения важны при лечении и дальнейшей реабилитации пациентов. В настоящее время не исследованными остаются взаимоотношения условно-патогенных бактерий и гельминтов в организме окончательного хозяина - человека, что актуализирует необходимость изучения влияния микропаразитоценоза на формирование дисбиоза толстой кишки у пациентов при инфекционно-инвазионном процессе. Исследование закономерностей функционирования микропаразитоценоза позволят определить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина.

Изучение микропаразитоценоза с позиций молекулярно-генетических исследований в разрезе микробиологических аспектов важно для рациональной профилактики инфекций и инвазий, представляющих чрезвычайно актуальную проблему.

В связи с этим, диссертационная работа, выполненная Катаевой Любовью Владимировной, посвященная изучению функционирования микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе, является актуальной и своевременной.

Научная новизна

В диссертационной работе на большом количестве клинического материала пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями представлена оценка особенностей кишечного микробиоценоза пациентов при описторхозе, лямблиозе, токсокарозе, токсоплазмозе и иксодовом клещевом боррелиозе. Показано влияние описторхозной инвазии на колонизацию организма человека штаммами *E. coli* - носителями кластеров генов вирулентности, что связано с воздействием метаболитов *O. felineus*. Разработана новая система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий, позволяющая определять наличие генетических детерминант штаммов: аэробактин *iuc*, гемолизин *hly*, колибактин *clb* (патент на изобретение РФ № 2662930). Впервые установлено, что в структуре микробиоценоза промежуточных хозяев *O. felineus* (моллюски, рыба) бактерии рода *Aeromonas* занимают доминирующее положение. Это позволило воду и рыбу рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции, а бактерии рода *Aeromonas* - в качестве критерия микробиологической оценки водных объектов и рыбной продукции. Показана их этиологическая значимость в инфекционном процессе. Предложен способ определения границ природных очагов биогельминтозов, позволяющий применять генетические маркеры для выявления локализации популяции карповых рыб в водных объектах для установления пределов их распространения (патент на изобретение РФ № 2545707). Разработан способ определения источника заражения при расшифровке вспышек бактериальных инфекций, основанный на кластерном анализе

протеинограмм штаммов предполагаемых возбудителей (патент на изобретение РФ № 2696101).

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

Достоверность полученных результатов обусловлена современными теоретическими положениями, основанными на глубоком анализе литературы, использованием общепринятых методик с применением классических бактериологических и паразитологических методов и современных методов: масс-спектрометрический, молекулярно-генетические (полногеномное секвенирование, филогенетический анализ). Применялись микробиологические методы исследования объектов окружающей среды, проводились экспериментальные исследования на животных с использованием паразитологических методов (ихтиопаразитологические, малакологические, неполное гельминтологическое вскрытие млекопитающих и сокультивирование бактерий с маритами гельминта). Весь материал обработан с использованием статистических методов, позволивших автору сформулировать выводы на основе принципов доказательной медицины.

Исследовано 811 микробиоценозов толстой кишки пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями; 248 объектов окружающей среды (вода открытых водоемов, придонный грунт, лечебная грязь); микробиоценоз промежуточных хозяев возбудителя описторхоза изучен у 153 особей. Выделено 1412 штаммов бактерий, изучен состав и свойства персистенции условно-патогенных микросимбионтов, в том числе бактерий рода *Aeromonas*.

Таким образом, автором были в полной мере решены поставленные задачи, соответствующие обозначенной цели. Выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейших исследований, сформулированные автором, являются достоверными и логично вытекают из результатов исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что на основании результатов исследования показано новое направление оценки состояния

микроработитоценоза в звене окончательного и промежуточных хозяев *O. felineus*, позволяющего на основе комплексной оценки микробиоценоза толстой кишки человека определить его характеристику при инфекционно-инвазионных заболеваниях. Выявлены качественные и количественные особенности микробиоты, свидетельствующие о нарушении микробиоценоза толстой кишки, что обосновывает необходимость включения пробиотических препаратов в схемы лечения пациентов с паразитозами. Экспериментально выявленные взаимодействия *K. pneumoniae*, *S. aureus* и метаболитов мариит *O. felineus* позволили теоретически обосновать особенности функционирования микроработитоценоза в паразитарной системе и определить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина.

Практическая значимость заключается в том, что даны рекомендации использования комплекса диагностических тестов, включающих исследование микробиоценоза толстой кишки у пациентов при обследовании на паразитозы. Это позволит провести его коррекцию и будет способствовать профилактике воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Обосновано включение пробиотиков на основе *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в схемы лечения паразитарно-инфекционной патологии. Выдвинута и теоретически обоснована гипотеза о влиянии свойств персистенции резидентных бактерий моллюсков на приживаемость яиц и развитие личиночных стадий гельминта в их теле, обуславливающее устойчивое функционирование паразитарной системы. Показана необходимость доработки схем идентификации *Aeromonas spp.* и включения указанных бактерий в качестве критерия санитарно-гигиенической оценки объектов окружающей среды. Предложено для улучшения диагностики возбудителей урогенитальной инфекции использовать метод масс-спектрометрии при проведении бактериологического исследования мочи с целью идентификации бактерий рода *Aeromonas*. В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы 26 штаммов (*E. coli*, *Aeromonas spp.*, *Acinetobacter baumannii*), изолированные от пациентов с паразитозами, отличающиеся кластерами генов вирулентности; из

воды водоемов, рыб, отличающиеся резистентностью к антимикробным препаратам. Депонированные штаммы могут применяться для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых перспективных антимикробных препаратов и в целях проведения молекулярно-генетических исследований. В международном банке данных GenBank депонированы нуклеотидные последовательности 13 штаммов, носителей генов, ассоциированных с вирулентностью и резистентностью. Сформирована рабочая коллекция штаммов, изолированных от пациентов с инфекционно-паразитарной патологией и объектов окружающей среды. Результаты диссертационной работы внедрены в образовательный процесс кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения от 29.01.2020 г.) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области» (акт внедрения от 15.01.2020 г.) как региональный компонент медицинской паразитологии. Материалы диссертации вошли в дополнительные образовательные программы повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей на базе ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора по специальности «Бактериология» (акт внедрения от 13.01.2020 г.).

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Результаты исследований доложены на 12 международных, всероссийских и региональных конференциях. Материалы диссертации полно отражены в 46 печатных работах, в том числе в 19 публикациях в изданиях, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных журналах, 23 - в материалах конференций и прочих изданиях. Получено 4 патента РФ на изобретение. Материалы диссертации вошли в три научных отчета и два аналитических обзора. Апробация диссертации проведена на заседании Ученого совета ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора (протокол № 1 от 23.01.2020 г.).

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Структура диссертационной работы Катаевой Любови Владимировны построена по традиционному плану. Диссертация состоит из введения, обзора

литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы и списка сокращений. Материалы диссертации изложены на 256 страницах, иллюстрированы 28 таблицами, 46 рисунками.

Во введении представлены актуальность проблемы, степень разработанности темы, цель, задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Диссертантом подробно изложена методология и методы исследования, использованные для достижения цели, определен предмет изучения и дана характеристика материалов исследования. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность полученных результатов.

Обзор литературы основан на 313 литературных источниках, из которых 193 отечественных, 120 — зарубежных. В обзоре литературы проанализирован большой объем информации, подчеркивающий важность и многогранность функций микробиоты макроорганизма. Приводятся немногочисленные данные о влиянии паразитарной инвазии на микробиоценоз толстой кишки человека и отсутствуют сведения о составе этиологически значимых возбудителей инфекций, входящих в микропаразитоценоз. Результаты работы с литературой свидетельствуют о том, что не изученными остаются вопросы микробиоты гельминтов, межмикробных взаимоотношений, персистентных свойств микрофлоры, являющейся системообразующим фактором микропаразитоценоза. Обозначенные проблемы, требующие решения, позволили автору сформулировать тему исследования, цель и задачи.

Результаты собственных исследований представлены 4 главами.

Во второй главе «Видовой состав и структура микробиоценоза толстой кишки при паразитарных инвазиях» представлены данные о состоянии микробиоценоза толстой кишки пациентов при инфекционно-инвазионном процессе. Показано, что при паразитарных инвазиях зарегистрированы нарушения микробиоценоза кишечника по содержанию симбионтной и условно-патогенной микрофлоры. При лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом

боррелиозе выявлен выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*, при описторхозе – *Bifidobacterium spp.* Среди условно-патогенных микроорганизмов чаще высевались бактерии рода *Klebsiella*. Бактерии рода *Proteus* большей частью высевались при иксодовом клещевом боррелиозе. Снижение количественного содержания *Bifidobacterium spp.* в структуре микрофлоры толстой кишки способствовало повышению частоты обнаружения условно-патогенных микроорганизмов, в большинстве случаев, бактерий рода *Klebsiella* и *S. aureus*. Снижение количественного содержания *Lactobacillus spp.* в меньшей степени влияло на частоту выявления условно-патогенной флоры. Представленные данные молекулярно-генетических исследований штаммов *E. coli* свидетельствовали о том, что описторхозная инвазия в большей степени влияет на колонизацию организма человека штаммами *E. coli*, носителями кластеров генов, ассоциированных с вирулентностью, что возможно связано с нарушением иммунитета и более выраженным влиянием метаболитов *O. felineus*. Исследование микрoэкологической системы кишечника при различных паразитарных инвазиях является важным звеном в изучении патогенетических механизмов взаимовлияния симбионтов на организм человека. Указанные нарушения микробиоценоза толстой кишки позволили обосновать целесообразность индивидуального выбора пробиотического препарата для пациентов, страдающих паразитарной инвазией.

В третьей главе диссертантом представлены материалы, демонстрирующие паразитоценотические отношения в микропопуляциях условно-патогенных бактерий и марит *Opisthorchis felineus*. Показано, что в эксперименте *in vitro* при совместном культивировании метаболиты марит *O. felineus* оказывают ингибирующее влияние на персистенцию бактерий *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. Полученные Катаевой Любовью Владимировной результаты раскрывают некоторые патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина, а также факторы, влияющие на состав кишечной микрофлоры и биологические свойства отдельных ее видов при паразитозах. Результаты этих экспериментальных исследований определили дальнейшие перспективы изучения

микропаразитоценозов с применением молекулярно-генетических методов.

Четвертая глава посвящена исследованию микробиоценоза моллюсков семейства *Bithyniidae* – первых промежуточных хозяев *O. felineus*. Показано, что в системе «паразит-хозяин» при описторхозе микробиоценоз моллюсков рассматривается как основа формирования симбиотических отношений. Автором установлена резидентная и транзитная микробиота моллюсков, которая, оказывает влияние на его защитные механизмы. Иммунный статус организма моллюсков зависит не только от состава его микробиоты, участвующей в выработке иммунных комплексов, но и от ее биологических свойств, в частности антилизосимной активности и биопленкообразования. Результаты изучения микропаразитоценоза промежуточных хозяев *O. felineus* свидетельствовали о том, что в начале эпидсезона в структуре микробиоты преобладали бактерии рода *Aeromonas* как в целом, так и по видовому разнообразию, которые к концу лета «замещались» НГОБ. *Aeromonas* в начале летнего сезона отличались невысокими показателями антилизосимной активности (0,7 мкг/мл ОП), в то же время бактерии группы НГОБ, накапливаясь к августу, обладали более выраженной антилизосимной активностью (1,54 мкг/мл ОП).

В пятой главе «Распространенность бактерии рода *Aeromonas*» автор обосновывает этиологическую значимость этих бактерий как возбудителей бактериальных инфекций, прежде всего мочевыделительной системы. Видовое разнообразие этих бактерий, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам, подтверждают их роль в развитии инфекционного процесса. Учитывая выраженную вариацию биохимических признаков бактерий рода *Aeromonas*, существует необходимость разработки диагностических препаратов для их идентификации. Полученные результаты исследования объектов окружающей среды и рыбной продукции свидетельствовали об их контаминации этими бактериями. Микроорганизмы, изолированные из рыб, инвазированных личинками возбудителя описторхоза, относятся к условно-патогенным бактериям и играют существенную роль в этиологии воспалительных заболеваний кожи рыб, что влияет на качество

пищевой рыбной продукции. Для снижения распространения инфекций, обусловленных *Aeromonas spp.*, необходимо проведение микробиологических исследований водных объектов, объектов окружающей среды и пищевых продуктов. Сравнительный анализ дендрограмм клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida* и *A. veronii* со штаммами, выделенными из воды и рыб, высокий коэффициент корреляции их белковых спектров, свидетельствовал о том, что воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции.

В разделе «Заключение» проанализированы полученные материалы, дана их оценка с использованием сведений мировой литературы, подчеркнута их теоретическая и практическая значимость. Данные литературы также дали возможность Катаевой Любови Владимировне обосновать и объяснить собственные результаты исследований, что демонстрирует заключение диссертации. Выводы работы достоверны, убедительны, полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Диссертационная работа Катаевой Л.В. представляет определенный интерес для научного сообщества, специалистов практического здравоохранения и эпидемиологической службы. В разделе «Практические рекомендации» определены предложения по схемам лечения паразитозов, необходимо включать пробиотики на основе: *Bifidobacterium spp.* при описторхозе, *Lactobacillus spp.* - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе; по применению метода масс-спектрометрии при идентификации бактерий рода *Aeromonas*, использование протеомного анализа для определения источника заражения при расшифровке вспышек бактериальных инфекций. Определены перспективы дальнейшей разработки темы.

Таким образом, диссертационная работа Катаевой Любови Владимировны может быть квалифицирована как завершённое диссертационное исследование, которое по научно-практической значимости, объёму исследований, новизне и ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Результаты могут быть

использованы для разработки мероприятий по улучшению качества жизни пациентов с паразитарными инвазиями и снижения у них риска развития вторичных бактериальных инфекций. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационного исследования.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, предложенным научным положениям и выводам диссертационная работа Катаевой Л.В. соответствует паспортам специальностей научных работников: 03.02.03 – микробиология (медицинские науки) и области исследования: пункты 1 – «Проблема эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 2 – «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне», 6 – «Сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов»; 03.02.11 – паразитология (медицинские науки) и области исследования: пункты 1 – «Всестороннее изучение явлений и сущности паразитизма, закономерностей жизни паразитов и взаимодействия их с живой средой хозяев», 5 – «Изучение взаимоотношений в системе: хозяин – паразит». Принципиальные замечания диссертация не вызывает.

В процессе ознакомления с диссертацией возник вопрос:

Как вы объясните, что при сокультивировании *K. pneumoniae* и *O. felinus* на 5 - 6 сутки наблюдения количество бактерий в опыте снижалось, а на 7 - 8 сутки увеличивается и к 9-10 суткам опять снижается.

Заключение

Диссертационная работа Любови Владимировны Катаевой на тему «Микробиологические аспекты микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе» является законченным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы установления микробиологических закономерностей функционирования микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе на модели изучения межпопуляционных взаимодействий условно-патогенных бактерий и сочленов жизненного цикла *Opisthorchis felinus*,

имеющих важное значение для лечения и реабилитации больных паразитарными инвазиями и инфекциями.

Диссертационная работа Катаевой Любови Владимировны «Микробиологические аспекты микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 03.02.11 – паразитология по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор Любовь Владимировна Катаева заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 03.02.11 – паразитология.

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 170100 г. Тверь, ул. Советская, дом 4. Тел.+7(4822) 32-17-79. e-mail: info@tvgmu.ru

доктор медицинских наук,
профессор

Вячеслав Михайлович Червинцев

Подпись доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

кандидат биологических наук,
доцент



Валерия Геннадьевна Шестакова

18.02.2021 г.