

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.004.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМ. Г.Н. ГАБРИЧЕВСКОГО» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 19 мая 2022 г. № 1.

О присуждении Вакариной Арине Александровне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Литические свойства бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций» по специальности 1.5.11. – Микробиология принята к защите 15.03.2022 г. протокол № 2 диссертационным советом 64.1.004.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10). Диссертационный совет утвержден Приказом Министерства образования и науки РФ № 714/нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ № 791/нк от 09.12.2020 г. част. изм., приказ № 1040/нк от 13.10.2021 г. част. изм.

Соискатель Вакарина Арина Александровна, 1979 года рождения. В 2002 году окончила Уральскую государственную медицинскую академию, медико-профилактический факультет, присуждена квалификация «Врач - медико-профилактическое дело».

В 2018 г. была прикреплена в качестве соискателя к Федеральному бюджетному учреждению науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (приказ № 2 от 12.02.2018 г.) для подготовки диссертационного исследования на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11. - микробиология (медицинские науки). Справка об обучении № 17 выдана 14.06.2019 года Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

С 2004 г. и по настоящее время Вакарина А.А. работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов (группы клинической бактериологии) Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена на базе лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов (группы клинической бактериологии) Федерального бюджетного учреждения науки

«Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научные руководители: **Степанова Татьяна Федоровна** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор; **Рубальский Евгений Олегович** кандидат биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория кокковых инфекций, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты: **Туйгунов Марсель Маратович**, доктор медицинских наук (03.00.07- микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, заведующий; **Гаевская Наталья Евгеньевна** - кандидат медицинских наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ведущий научный сотрудник, лаборатория бактериофагов, руководитель, и.о. начальника отдела диагностических препаратов – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в своем положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук Алешукиной Анной Валентиновной, лаборатория вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов, руководитель, указала, что диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи – изучение литических свойств генетически подтвержденных вирулентных бактериофагов, их влияние на антибиотикорезистентность бактерий, разработка способа количественной оценки литической активности бактериофагов.

Сонскатель имеет 17 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых изданиях, 1 статья - в другом издании, 2 тезиса в рецензируемых изданиях, 8 публикаций в сборниках научных трудов и материалах конференций, получен 1 патент РФ на изобретение, общий объем работ составляет 96 страниц с авторским вкладом – 64 страниц.

Наиболее значимые работы: 1) Вакарина, А.А. Влияние бактериофагов на чувствительность условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева, Т.Ф. Степанова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2019. - № 2. - С. 3-7; 2) Вакарина, А.А. Влияние вирулентных

бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий *Staphylococcus aureus* / А.А. Вакарина, А.В. Алешкин, Е.О. Рубальский, Т.Ф. Степанова, И.А. Киселева, Л.В. Катаева // Астраханский медицинский журнал. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 29-39; 3) Вакарина, А.А. Влияние вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий вида *Proteus mirabilis* / А.А. Вакарина, А.В. Алешкин, Е.О. Рубальский, Т.Ф. Степанова, И.А. Киселева, Л.В. Катаева, Э.Р. Зулькарнеев, Р.С. Календр // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова - 2021. – Т. 17, № 2. – С. 18 -25.

На диссертацию и автореферат поступило 6 положительных отзывов без замечаний от: 1) д.м.н., профессора Базикова И.А., заведующего кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» МЗ РФ; 2) д.м.н., доцента Захаровой Ю.В., профессора кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» МЗ РФ; 3) д.м.н., доцента Исаевой Г.Ш., заместителя директора по инновационному развитию ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора; 4) д.м.н., профессора Рудакова Н.В., директора ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора 5) д.м.н., профессора Чесноковой М.Г., профессора кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ, 6) д.м.н. Гальцевой Г.В. с.н.с, врача-бактериолога, эпидемиолога ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора. В отзывах отмечено, что в ходе диссертационного исследования представлены основные литические свойства коммерческих фагосодержащих препаратов и коллекционных штаммов вирулентных бактериофагов, изучено их влияние антибиотикочувствительность бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний. Предложен и разработан способ количественной оценки литической активности бактериофагов.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в изучении значимых для здоровья человека микроорганизмов и способов их идентификации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработано новое решение актуальной задачи обеспечения биологической безопасности медицинской помощи пациентам акушерских стационаров. Показано становление возбудителей, обладающих селективными преимуществами выживания в окружающей среде акушерского стационара, в период благоприятной эпидемиологической ситуации, характеризующийся низкими показателями инфекционной заболеваемости пациентов и резистентностью штаммов, изолированных из производственной среды. Предложены два штамма вирулентных бактериофагов, активных в отношении бактерий *Proteus mirabilis*, изолированных в период, характеризующийся формированием возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в акушерском стационаре. Доказано, что расчет отношения шансов литической активности бактериофагов при параллельном

(одномоментном) исследовании чувствительности бактерий к бактериофагам показал большее количество устойчивых штаммов бактерий при использовании плотного питательного агара, чем при постановке методом с питательным бульоном. Введен алгоритм количественной оценки литической активности бактериофагов, основанный на измерении оптической плотности жидкой питательной среды взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг».

Теоретическая значимость диссертационной работы обоснована тем, что доказаны особенности литических свойств вирулентных бактериофагов, отсутствие их влияния на антибиотикочувствительность возбудителей бактериальных инфекций, что расширяет область знаний о природных антимикробных средствах – бактериофагах и их использование в лечебно-профилактических целях. Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс методов: бактериологических, серологических, методов исследования бактериофагов, молекулярно-генетических, биоинформатических, аналитических и статистических, которые позволили всесторонне изучить свойства и взаимодействие системы «бактериофаг-бактерия». Изложены данные о низкой чувствительности штаммов *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.* и *Escherichia coli* серотипа O26 к специфическим коммерческим бактериофагам, указывающие на необходимость коррекции маточного состава фагосодержащих лекарственных средств в отношении бактерий *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* и патогенной *E. coli*, а также внедрения мониторинга эффективности препаратов на различных уровнях (локальный, региональный, национальный). Раскрыты различия литической активности вирионов при использовании различных методов на плотной и в жидкой питательной среде, изложена необходимость разработки новых способов определения чувствительности бактерий к бактериофаговым коктейлям. Изучены морфологические свойства и таксономическое положение двух бактериофагов, с помощью проведенного полногеномного секвенирования установлена молекулярно-генетическая структура с подтверждением их вирулентной (строго литической) природы; в соответствии с кладограммами и множественным полногеномным выравниванием показано, что исследуемые штаммы протейных бактериофагов принадлежали к порядку хвостатых фагов – *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae*. На основании базы данных GenBank, бактериофаг *Proteus phage* 2207-№35 относился к роду *Gorganvirus*, а бактериофаг *Proteus phage* P16-2532 показал отсутствие принадлежности к какому-либо таксону нижестоящего ранга. Проведена модернизация метода оценки литической активности бактериофагов, позволяющая определить эффективность бактериофага в цифровых значениях, что увеличит клиническую и эпидемиологическую результативность использования вирионов в целях локализации и ликвидации очагов инфекции.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработан и внедрен способ количественной оценки литической активности бактериофагов в работу бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (акт внедрения от 13.01.21 г.), на кафедре микробиологии ГБОУ ВО «Тюменский

государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения № 1 от 04.02.2021 г.) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области» (акт внедрения от 02.02.2021 г.). Определена возможность использования бактериофагов в комбинации с антимикробными препаратами в лечебно - профилактической деятельности. Создан алгоритм выявления потенциальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, за счет резистентности к антимикробным препаратам, что является основанием разработки корректирующих мероприятий по ликвидации и недопущению распространения бактерий, обладающих патогенными свойствами. Представлены аннотированные полногеномные последовательности выделенных штаммов *Proteus phage* являющихся перспективными для разработки лекарственных препаратов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что для экспериментальных работ объем фактического материала является достаточным, методы статистической обработки подобраны адекватно, эксперименты проведены на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов и сертифицированного оборудования. Теория исследования построена на известных данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными, посвященными изучению литических свойств бактериофагов и их влиянию на антибиотикочувствительность бактерий. В ходе подготовки диссертационной работы исследован значительный объем материала, выделено 6760 бактериальных культур из различных локусов пациентов, исследован 1821 смыв с поверхностей в учреждениях родовспоможения. Исследование влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к антибиотикам проведено на 97 штаммах рода *Klebsiella* и 108 - *S. aureus*, для подтверждения полученных результатов скрининга определены пары «вирулентный бактериофаг - бактерия». От пациентов с острыми кишечными инфекциями идентифицировано 2268 видов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, определена их чувствительность к бактериофагам. Литические свойства бактериофагов на плотной и в жидкой питательных средах исследованы на 165 штаммах *S. aureus* и 62 - *K. pneumoniae*. Предложенный «Способ количественной оценки литической активности бактериофагов» оценен на 36 штаммах *S. aureus* и *E. coli*. Идея базируется на известных теоретических и практических материалах и согласуется с опубликованными экспериментальными данными, посвященными возбудителям бактериальных инфекций и литическим свойствам бактериофагов. Использован сравнительный анализ данных авторов и других исследователей по вопросам принципов становления возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи; спектра чувствительности бактерий к бактериофагам и методов определения их литической активности. Установлено, что большинство результатов проведенных автором исследований согласуется с результатами других авторов, представленных в независимых источниках, и дополняет их. Используются дизайн, классические и современные методы исследования бактерий и бактериофагов, биоинформатический анализ, статистические методы на основе лицензионного программного пакета SPSS.

Личное участие соискателя заключалось в разработке дизайна диссертации, изучении научных публикаций по тематике исследования, обобщении и анализе результатов. Автор самостоятельно сформулировала выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Совместно с сотрудниками ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора: подготовила анкеты-опросники родильниц (совместно с г.н.с. отдела эпидемиологического анализа и моделирования, д.м.н. А.С. Корначевым); выделяла и идентифицировала бактериальные штаммы (классическим бактериологическим методом, методом масс-спектрометрии), участвовала в постановке реакций агглютинации, определяла чувствительность бактерий к антибиотикам (совместно с м.н.с. лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов (группы клинической лаборатории) О.В. Посоюзных и О.Н. Колотовой); разработала способ количественной оценки литической активности бактериофагов, используя образцы бактерий *E. coli* и *S. aureus* (совместно с г.н.с. лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов (группы клинической лаборатории), д.м.н. Л.В. Катаевой). Совместно со старшими научными сотрудниками лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора: к.б.н. Е.Р. Зулкарнеевым и к.б.н. И.А. Киселевой осуществляла выделение протейных и стафилококковых штаммов бактериофагов, изучала их литические свойства и определяла титры. Под руководством М.К. Грибоедовой, главного врача ГБУЗ ТО «Родильный дом № 2» и Е.В. Косоруковой заместителя главного врача по лечебной работе ГБУЗ ТО Тюменской области «Родильный дом № 3» совместно с сотрудниками акушерских стационаров был получен биоматериал от пациентов, а также проведены смывы с объектов окружающей среды.

На заседании 19 мая 2022 года диссертационный совет принял решение присудить Вакариной Арине Александровне ученую степень кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 11 докторов наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовал за – 16, против – 1, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Алешкин Владимир Андрианович

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна



20.05.2022 г