

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата медицинских наук Гаевской Натальи Евгеньевны на диссертационную работу Вакариной Арины Александровны на тему: «Литические свойства бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11.–микробиология (медицинские науки)

Актуальность темы выполненной работы

Сложность лечения пациентов определяется многими факторами, среди которых одно из главных мест занимают бактериальные инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Широкая адаптогенная способность этих микроорганизмов к агрессивным факторам производственной среды стационаров приводит к возникновению и распространению резистентных бактерий к различным классам антимикробных препаратов. В этиологической структуре инфекций ведущая роль принадлежит ESKAPE-патогенам. Знания о наиболее вероятных бактериальных агентах – возбудителях инфекционного процесса позволяют сформировать реальные представления об эпидемиологической ситуации в медицинской организации и разработать планы мероприятий. Изучение закономерностей возникновения и развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, является ключевым моментом дальнейшего развития медицинских наук.

Стратегия сдерживания формирования и распространения возбудителей, обладающих резистентностью к лекарственным препаратам, предполагает разработку оригинальных антимикробных препаратов, создание альтернативных методов лечения с применением бактериофагов, а также комбинирование различных лекарственных средств, основанных на принципах доказательной медицины.

В зарубежной литературе имеются указания на единичные исследования, посвященные воздействию бактериофагов на антибиотикочувствительность бактериальной клетки. В зависимости от вида антибиотика и бактериофага, установлены явления синергизма, аддитивизма и антагонизма как эффекты

сочетанного влияния препаратов. Отсутствие достаточного объема исследований *in vitro* и оценки результатов фаготерапии *in vivo* в соответствии с «золотым стандартом» двойного слепого испытания подтверждают важность темы диссертационной работы.

Очевидным являются преимущества в использовании бактериофагов для лечебно-профилактических целей. Особенностью их действия является узконаправленный эффект, как правило, адресованный на один вид или чаще штамм бактерий, исключая отрицательное влияние на нормобиоценоз пациентов. Кроме того, отсутствие противопоказаний, побочных действий, а также зарегистрированных аллергических случаев у пациентов дают возможность активно применять бактериофаги. Выделение и изучение новых штаммов бактериофагов необходимо в борьбе с возбудителями бактериальных инфекций.

Активность фагосодержащих лекарственных средств зависит от состава входящих в коктейль штаммов, их концентрации (титра) и чувствительности бактерий. Анализ результатов научных исследований эффективности коммерческих бактериофагов свидетельствует о широком спектре их литической активности. Это определяет необходимость непрерывной системы слежения (мониторинга) за чувствительностью основных патогенных и условно-патогенных агентов к фаговым коктейлям, а также совершенствования методов изучения взаимодействия микроорганизмов.

Учитывая востребованность бактериофагов для использования в лечебно-профилактическом процессе, диссертационная работа Арины Александровны Вакариной, посвященная исследованию литических свойств бактериофагов, их влиянию на антибиотикорезистентность бактерий, а также изучению методов оценки активности вирионов является важной и актуальной.

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

Впервые продемонстрирован этап формирования возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, основанных на

изучении антибиотикорезистентности штаммов. В исследование включено одно из уязвимых звеньев системы здравоохранения – акушерские стационары. Доказано, что основной обмен генетической информацией между бактериальными штаммами происходит в содержимом толстой кишки новорождённых. Определено, что под влиянием агрессивных факторов госпитальной среды, становление возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, происходит за счет грамотрицательных бактерий. Предложенные и изученные молекулярно-генетическими методами новые штаммы бактериофагов (*Proteus phage* H16-2532 и 2207- № 35) активны в отношении бактерий, выделенных из лечебного учреждения.

Представлены данные об особенностях совместного влияния бактериофагов и антимикробных препаратов на условно-патогенные бактерии. При постановке серий экспериментальных исследований диско-диффузионным методом установлено отсутствие влияния литических бактериофагов на изменения диаметров зон задержки роста бактерий *Staphylococcus aureus* и *Proteus mirabilis* под действием антибиотиков. Статистическая обработка данных проведена с использованием интерквартильных размахов и критерия Вилькоксона.

Определена необходимость выделения новых или ротация имеющихся маточных бактериофагов, используемых в производстве фагосодержащих лекарственных средств, в отношении штаммов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* и патогенного штамма *Escherichia coli* O26. Указанные бактерии проявили чувствительность к бактериофагам в 2 раза реже в сравнении с другими исследованными изолятами.

Выявлены отличия по количеству чувствительных штаммов *S. aureus* к пиобактериофагу поливалентному и *Klebsiella pneumoniae* к трем исследуемым бактериофагам (клебсиелл пневмонии и клебсиелл поливалентному бактериофагам и пиобактериофагу поливалентному), полученные при изучении литической активности бактериофагов в параллельной постановке методами по М. О. Биргеру и Л. М. Майской.

Разработан «Способ количественной оценки литической активности бактериофагов», основанный на изменении оптической плотности жидкой питательной среды сокультивирования бактериальных культур и бактериофага. Жидкая питательная среда обеспечивает оптимальные условия для взаимодействия фагов с бактериальными клетками, а использование оптических систем позволяет исключить субъективизм при оценке результата.

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

Достоверность результатов определена большим объемом выборки и количеством изученных проб биоматериала, обеспечена использованием современных методов исследования: бактериологических, вирусологических, серологических, молекулярно-генетических с применением биоинформатического анализа. Дизайн диссертационной работы основан на анализе актуальных литературных источников, в том числе и зарубежных. Обоснования полученных результатов проведено с помощью программного пакета статистического анализа, предназначенного для научных исследований. Представленные автором выводы логически вытекают из полученных результатов исследования и соответствуют положениям, выносимым на защиту.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Высокие показатели заболеваемости и летальных исходов пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, определяют значимость научных исследований по данной тематике. Анализ эпидемической ситуации в лечебных организациях и своевременное проведение корректирующих мероприятий способствуют минимизации случаев бактериальных инфекций. Определение локуса становления субпопуляций бактерий, обладающих резистентностью к антимикробным препаратам, обеспечивает целенаправленный микробиологический мониторинг.

Выделенные протейные бактериофаги, полученные в ходе подготовки диссертационной работы, проявили свою литическую активность в отношении

бактериальных штаммов, циркулирующих в акушерском стационаре. Проведенный полногеномный анализ *Proteus phage* определил их строго литическую природу. Представленные характеристики позволяют рассмотреть данные бактериофаги как перспективные в фаготерапии. Аннотированные последовательности протейных штаммов бактериофагов депонированы в базу данных GenBank.

Расширение знаний о взаимодействии системы фаг-антибиотик-бактерия необходимы в разработке схем комбинированной терапии бактериальных инфекций. Результаты исследований влияния бактериофагов на клеточном уровне не противоречат сочетанному применению антимикробных препаратов и бактериофагов в лечебных целях.

Представленный мониторинг чувствительности возбудителей острых кишечных инфекций к бактериофагам определил важность маточного состава штаммов в фагосодержащих препаратах. Сфокусировано внимание на определенные виды бактериальных культур для научных исследований по выделению новых штаммов бактериофагов.

Зарегистрированная разница в количестве чувствительных штаммов к бактериофагам при использовании плотных и жидких питательных сред, подтвержденная статистическими методами, задает вектор для разработки новых способов определения литических свойств бактериофагов, необходимых для диагностических целей.

Разработанный и предложенный способ изучения активности бактериофагов повысит качество оценки литических свойств вирионов, что найдет отражение в эффективности лечебно-профилактических мероприятий.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Основные положения диссертационной работы доложены на международных и всероссийских научно-практических конференциях, посвященных актуальным аспектам применения бактериофагов в медицине,

ветеринарии и пищевой промышленности, а также современным технологиям в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями.

Разработанный автором «Способ оценки литической активности бактериофагов» внедрен в работу бактериологических лабораторий и введен в обучающий курс подготовки и повышения квалификации медицинского персонала.

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых изданиях. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Вакариной Арины Александровны является законченной научно-квалификационной работой. Изложена на 165 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками и 37 таблицами. Состоит из введения, основной части, пяти глав собственных разработок, заключения о выполненных исследованиях, перспектив дальнейшего изучения проблемы, изложен список сокращений и литература (228 источников, из которых 163 работы отечественных и 65 иностранных авторов). Задачи для решения поставленной автором цели полностью выполнены. По полученным результатам исследований Вакарин А. А. логично, научно-обосновано, с учетом данных российской и зарубежной литературы выстроила 6 выводов. Диссертантом всесторонне изучены литические особенности бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций. Структура и содержание диссертации в необходимом объеме представлены в автореферате, соответствуют ГОСТ 7.0.11-2011.

В разделе «**Введение**» представлена актуальность проблемы, выбранной для проведения исследований, степень разработанности темы, определены цель и задачи работы, четко и лаконично изложены научная новизна и научно-практическая значимость. В ходе подготовки диссертации использован полный комплекс современных, эффективных и рациональных методов испытаний. Статистический анализ выполнен с помощью лицензионного программного обеспечения для научных исследований. Сформулированы основные

положения, выносимые на защиту, обоснована степень достоверности, проведена апробация полученных результатов. Диссертант лично принимал активное участие в изучении образцов биоматериала и объектов окружающей среды, систематизации, анализе и оценке данных исследования.

В первой главе раскрыты современные представления о строении и роли бактериофагов в лечебно-профилактической деятельности, литической активности фагосодержащих лекарственных препаратов, а также о методах определения литических свойств бактериофагов.

Вторая глава посвящена изучению бактерий, циркулирующих в акушерских стационарах. Автором проанализирована антибиотикорезистентность штаммов, изолированных в ходе многолетнего микробиологического мониторинга, проведена связь между формированием резистентности и инфекционной заболеваемостью пациентов. Изучены основные локусы становления возбудителей - кишечник и кожа пупочного остатка новорожденных. Определена ведущая роль грамотрицательных культур в процессе нарастания уровня антибиотикорезистентности.

В третьей главе описаны результаты исследования по выделению и изучению новых штаммов бактериофагов, активных в отношении бактерий *Proteus mirabilis*, изолированных от пациентов акушерского стационара. В соответствии с морфологическими характеристиками колоний бактериофагов, кладограммами и множественными полногеномными выравниваниями, определяющими системное положение бактериофагов, а также отсутствием генов известных интеграз установлена вирулентная природа бактериофагов. Аннотированные полногеномные последовательности депонированы в базу данных NCBI Bank. Полученные автором данные свидетельствуют о перспективности бактериофагов для использования в лечебно-профилактической практике.

В четвертой главе представлены исследования о взаимодействии специфических бактериофагов и клинических штаммов бактерий.

Проведена серия экспериментальных работ с применением как фагосодержащих лекарственных коктейлей, так и монофагов, по изучению изменения задержки роста бактерий в зоне нанесения диска с антимикробным препаратом. Анализ полученных данных в соответствии со статистическим критерием Вилкоксона определил отсутствие влияния литических стафилококковых и протейных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактериальных изолятов.

Следующий подраздел главы посвящен изучению основных бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций, представленных семейством *Enterobacteriaceae*, а также региональным особенностям чувствительности бактерий к фагосодержащим лекарственным препаратам. Выявлена высокая резистентность бактерий *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* и патогенного штамма *E. coli* к ряду специфических бактериофагов.

Продемонстрированы сравнительные исследования литической активности фагосодержащих лекарственных средств при использовании методов на плотной и в жидкой питательных средах, определяющие статистическую разницу результатов.

В пятой главе собственных исследований представлен запатентованный способ количественной оценки литических свойств бактериофагов. Диссертантом рассчитано числовое пороговое значение литической активности бактериофага, определяющее назначение лекарственного фагопрепарата в лечебно-профилактических целях.

В заключение диссертант анализирует полученные данные, сопоставляя с данными литературы, подчеркивая актуальность и важность изучения бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций.

Выводы научно доказаны, убедительны, являются логическим завершением диссертационной работы, соответствуют целям и задачам исследования.

Соответствие специальности. Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 1.5.11. – микробиология.

Вопросы:

1. Каков Ваш взгляд на ближайшие перспективы использования бактериофагов в лечебной деятельности?
2. Как Вы можете объяснить разницу полученных результатов влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам в скрининговом и более углубленном исследовании.

Заключение

Диссертационная работа Арины Александровны Вакариной на тему «Литические свойства бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Татьяны Федоровны Степановой и кандидата биологических наук Рубальского Евгения Олеговича, является законченной научной работой, содержащей микробиологические аспекты становления возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, особенностей литических свойств бактериофагов и оптимизацию способа их оценки.

Диссертационная работа по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, № 650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года, № 1168 от 01 октября 2018 года, № 751 от 26 мая 2020 года, № 426 от 20 марта 2021 года, № 1539 от 11 сентября 2021 года «О внесении изменений в Положение о присуждении учёных

степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Вакарина Арина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. - микробиология.

Ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории бактериофагов, и.о. начальника отдела диагностических препаратов Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, телефон: 8 (863) 240-27-03, факс: 8 (863) 267-02-23, e-mail: gaevskaya.nata@mail.ru)

кандидат медицинских наук..........Наталья Евгеньевна Гаевская

Подпись Натальи Евгеньевны Гаевской заверяю:

и.о. ученого секретаря Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, телефон: 8 (863) 240-91-22, e-mail: markovskaya_ei@antiplague.ru)

кандидат медицинских наук..........Марковская Елена Ивановна

20.04.2022

