

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Марселя Маратовича Туйгунова на диссертационную работу Вакаринной 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

Устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам является основной причиной, ограничивающей эффективность антибактериальной терапии. Особый вклад в резистентность микроорганизмов принадлежит ESCAPE патогенам. В настоящее время проблема антибиотикорезистентности вышла за рамки стационаров и широко распространена у пациентов амбулаторно-поликлинической службы. По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году» наблюдается значительный рост регистрируемых случаев заболеваний по сравнению с 2019 годом. Пятикратное увеличение количества зафиксированных случаев инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, обусловлено пандемией COVID-19. Эти цифры указывают на значимость проведения предупреждающих противоэпидемических мероприятий по недопущению распространения инфекций в лечебных организациях.

Известно, что к типичным характеристикам возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, относятся: повышенная вирулентность, усиление адгезивных свойств, устойчивость во внешней среде, антибиотикорезистентность, способность длительно персистировать в больничных условиях. Поэтому, микробиологический мониторинг микрофлоры, циркулирующей в стационаре, имеет большое значение.

Бактериофаги способны лизировать бактериальные культуры, обладающие множественной лекарственной устойчивостью. Одним из

обязательных условий безопасного использования бактериофагов является их строго литическая природа. К классическим методам определения умеренных бактериофагов относятся исследования с ультрафиолетовым облучением и применением митомицина С. Современные методы ПЦР и полногеномного секвенирования позволяют определять наличие генов, кодирующих интегразы и их гомологи в нуклеотидных последовательностях бактериофагов.

В литературе имеются данные о комбинированной терапии бактериальных инфекций бактериофагами и антибиотиками. Целесообразность и антибактериальная активность применения разных по механизму действия групп препаратов во многом остаются открытыми.

Актуальность использования бактериофагов с лечебно-профилактической целью диктует необходимость определения чувствительности возбудителей бактериальных инфекций к существующим фагосодержащим препаратам. На сегодняшний день о спектре литической активности бактериофагов можно судить только из отдельных научных публикаций. Решение вопроса о назначении фаготерапии персонализировано и основывается на методе определения лизиса бактерий под каплей бактериофага.

В связи с этим, диссертационная работа Арины Александровны Вакариной, посвященная комплексному изучению литических свойств бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций, разработанному методу оценки их активности, является актуальной и важной.

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

Впервые представлены данные микробиологического мониторинга, позволяющие проследить этап формирования возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в содержимом толстой кишки новорожденных. Определена структура штаммов, обладающих селективными преимуществами выживания в условиях больничной среды акушерских стационаров за счет резистентности к антибиотикам.

Выделены штаммы протейных бактериофагов, которые по морфологии колоний, таксономическому положению и молекулярно-генетической структуре, указывающей на отсутствие известных и гомологичных интеграз прокариот и вирусов, относятся к вирулентным. Показана их активность в отношении бактерий, циркулирующих в акушерском стационаре.

Проведена оценка взаимодействия комплекса «бактерия-бактериофаг-антибиотик». Выявлено отсутствие влияния строго литических протейных и стафилококковых бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий.

Региональный мониторинг чувствительности к лечебным бактериофагам бактерий, циркулирующих на территории Тюмени и юга Тюменской области, определил их низкий уровень литической активности в отношении штаммов *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* и патогенных *Escherichia coli*.

Результаты определения литической активности бактериофагов на плотной и в жидкой питательных средах (методы Л. М. Майской и М.О. Биргера) свидетельствуют о статистически значимых отличиях. Разработан принципиально новый подход по оценке литической активности бактериофагов, основанный не на изучении количества негативных колоний (БОЕ) или увеличении титра вирионов при взаимодействии с бактериями, а на определении нарастания бактериальной массы в жидкой питательной среде при устойчивости бактерий к бактериофагам. Исследование построено на изменении оптической плотности питательного бульона - среды взаимодействия бактерий и бактериофагов с интерпретацией результата в числовых значениях.

Научные положения, выводы и практические рекомендации рецензируемой работы, сформулированные соискателем, имеют аргументируемые результаты, определенные современными методами статистической обработки.

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

Достоверность результатов диссертации не вызывает сомнения, работа

выполнена с проведением большого количества исследований, прослеживается репрезентативность выборок. Использовался комплекс современных методов: микробиологических, серологических, вирусологических, молекулярно-генетических, аналитических, в том числе биоинформатического анализа. Статистическая обработка данных диссертационного исследования производилась с помощью лицензионного программного обеспечения SPSS. Результаты, полученные автором, свидетельствуют о решении поставленных цели и задач, и согласуются с научной литературой по выбранной тематике. Положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации обоснованы и полноценно отражают проведенные исследования.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Представленная система микробиологического мониторинга определяет начальный этап формирования возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, основанный на резистентности циркулирующих штаммов в акушерском стационаре. Эти данные необходимы для своевременного проведения дополнительных профилактических и санитарно-противоэпидемических мероприятий по недопущению распространения бактерий, обладающих патогенным потенциалом. Определение кишечника новорожденных, как основного места обмена генетической информацией микроорганизмов, дает возможность сделать основные акценты исследований на данный локус, в том числе с применением методов молекулярной генетики.

Выделенные вирулентные штаммы бактериофагов, активные в отношении бактерий *Proteus mirabilis*, являются перспективными для производства лекарственных препаратов. Аннотированные полногеномные последовательности *Proteus phage* P16-2532 и 2207-№35 депонированы в базе данных NCBI GenBank (MN840486.1 и MN840487.1).

Представленный анализ чувствительности к бактериофагам основных бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций определяет значимость применения фагосодержащих лекарственных препаратов. Установленная низкая чувствительность штаммов *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* и

патогенной *E. coli* 026 к специфическим бактериофагам выявила необходимость актуализации спектра производственных маточных штаммов и внедрения системы мониторинга на различных уровнях в РФ.

Отсутствие влияния литических бактериофагов на изменение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам определяет возможность комбинирования бактериофагов и антибиотиков в лечебной практике.

Установленная разница количества чувствительных бактерий при использовании методов с жидкими и плотными питательными средами послужит основой для разработки новых подходов определения литических свойств бактериофагов.

Представленный способ количественной оценки литической активности бактериофагов дает возможность измерять нарастание бактериальной массы в цифровых значениях стандартизированным оборудованием, что позволяет исключить субъективизм при оценке результата. Применение жидкой питательной среды создает оптимальные условия для хемотаксиса бактерий. Кроме того, допускается одномоментная постановка большого количества исследований с использованием незначительного объема расходных материалов. Предлагаемый способ обеспечивает повышение эффективности фаготерапии.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Результаты доложены и обсуждены на 4 научных конференциях, в том числе с международным участием. По теме диссертации опубликовано 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.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации
Материалы диссертационной работы Вакариной А.А. изложены на 165

страницах машинописного текста и иллюстрированы 20 рисунками, 37 таблицами. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 228 источников, из которых 163 - отечественных и 65 – зарубежных авторов. Оформление диссертации полностью соответствует требованиям ВАК РФ.

В разделе **«Введение»** освещены вопросы актуальности выбранной темы диссертационной работы и ее степень разработанности, определены цели и задачи исследования, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту. Достаточно подробно изложены вопросы методологии и методов проведенных испытаний с использованием современного и информативного оборудования. Обозначены сведения о личном участии автора, апробации основных результатов, а также практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Раздел собственных исследований состоит из пяти глав. В первой главе **«Обзор литературы»** представлены данные о бактериофагах – антимикробных препаратах природного происхождения. Автор дает разностороннюю характеристику вирионов, касающуюся их морфологии, литических свойств в отношении возбудителей бактериальных заболеваний, генетических особенностей, существующих методов определения чувствительности бактерий к бактериофагам.

Вторая глава посвящена актуальной проблеме формирования возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Изучены данные независимого анкетирования пациентов акушерских стационаров; проведен микробиологический мониторинг чувствительности бактерий к антимикробным препаратам, выделенных от новорождённых, родильниц, с объектов окружающей среды; представлен анализ динамики инфекционной заболеваемости. Представлена структура вероятных

возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, обладающих резистентностью к антибиотикам.

В третьей главе автор исследует выделенные штаммы протейных бактериофагов. Описаны морфологические свойства колоний бактериофагов. Определено системное положение вирионов на основании кладограмм и множественных полногеномных выравниваний (порядок хвостатых фагов – *Caudovirales*, семейство *Siphoviridae*, на основании базы данных Genbank бактериофаг *Proteus phage 2207-№35* относится к роду *Gorganvirus*). В представленной диссертационной работе проанализированы открытые рамки считывания с предсказанной функцией на выявление известных, а также гомологичных им интеграз прокариот и их вирусов. В исследовании установлена литическая активность бактериофагов в отношении бактерий, изолированных в акушерском стационаре. На основании этих данных, литические бактериофаги определены как перспективные для производственных целей.

Четвертая глава посвящена взаимодействию специфических бактериофагов и клинических штаммов бактерий. Автор оценивает влияние бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий. Приводит результаты исследований литической активности коммерческих фагосодержащих лекарственных препаратов в отношении возбудителей острых кишечных инфекций, а также оценивает результаты чувствительности бактерий к бактериофагам при параллельном использовании разных методов.

«Способ количественной оценки литической активности бактериофагов» (**глава 5**) основан на изменении оптической плотности жидкой питательной среды взаимодействия бактериофага и бактериальной культуры. В соответствии с полученной оптической плотностью анализата и количеством выросших колоний при высеве из лунок с образцом, определено пороговое значение, указывающее на литическую способность бактериофага и чувствительность к нему бактерий.

В «**Заключении**» тщательно проанализированы полученные результаты исследований, сопоставлены с литературными источниками как отечественных так и зарубежных авторов. **Выводы** работы научно обоснованы, достоверны и убедительны. Автор полностью справился с поставленными целями и задачами.

В практических рекомендациях определены предложения по микробиологическому мониторингу основных возбудителей бактериальных инфекций и дальнейшие направления по изучению бактериофагов для использования в лечебных целях.

Соответствие специальности. Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 1.5.11. – микробиология. Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Вопросы:

1. Как Вы думаете, чем обусловлен широкий диапазон чувствительности бактериальных штаммов к коммерческим фагосодержащим лекарственным препаратам?

2. Было изучено влияние литических бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий, какой критерий статистической оценки данных был выбран и почему?

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 Евгения Олеговича Рубальского, является законченной научной работой, в которой представлено новое решение актуальной задачи - изучение литических свойств генетически подтвержденных бактериофагов и их влияния на антибиотикорезистентность возбудителей бактериальных инфекций.

Диссертационная работа по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, практической значимости 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.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3, тел. 8 (347) 272-41-73, e-mail: rectorat@bashgmu.ru)

Доктор медицинских наук,
профессор

Марсель Маратович Туйгунов

25.04.2022 г.

Подпись Туйгунова Марселя Маратовича заверяю:

Ученый секретарь федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3, тел. 8 (347) 272-02-22, e-mail: rectorat@bashgmu.ru)

Доктор фармацевтических наук,
профессор

Подпись:

Заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России

Мещерякова Светлана Алексеевна

25.04.2022 г.