

«Утверждаю»
директор ФБУН
«Ростовский научно-исследовательский
институт микробиологии и паразитологии»

Роспотребнадзора
доктор медицинских наук
Татьяна Ивановна Твердохлебова



«27» апреля 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы 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

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, являются одной из наиболее актуальных проблем системы здравоохранения. Они характеризуются высокими темпами эволюции и полиорганным тропизмом возбудителей, клиническим полиморфизмом, подчас нечетко выраженной специфичностью картины заболевания. Значительная роль в структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, принадлежит условно-патогенным бактериям, при этом наибольший удельный вес обусловлен штаммами семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующими грамотрицательными изолятами. Становлению высокоадаптированных линий микроорганизмов способствуют: агрессивные факторы госпитальной среды (антибиотики, дезинфицирующие средства, антисептики), сниженный иммунный статус пациента, возможность активного обмена генетической информацией штаммов бактерий, благодаря укрупнению больничных комплексов.

Приобретение бактериями детерминант резистентности ставит задачу разработки новых препаратов и поиска комбинированных схем лечения заболеваний. Бактериофаги являются альтернативой в решении данного вопроса.

Вирионы обладают рядом преимуществ: не оказывают влияния на нормобиоценоз человека, не имеют противопоказаний и побочных действий, стимулируют иммунную систему, могут воздействовать на штаммы бактерий, характеризующиеся полирезистентностью к антимикробным средствам.

Применение комбинации бактериофагов и антибиотиков в лечебно-профилактических целях необходимо рассматривать с разных позиций. Это снижение эффективности антибиотика, уменьшение титра вирионов, а также совместного результата действия разных групп препаратов на персистенцию бактериальной клетки.

Рациональная фаготерапия строится на определении чувствительности бактерий к бактериофагу. Анализ литературных данных указывает на большой диапазон чувствительности значимых бактериальных изолятов к имеющимся фагосодержащим препаратам. Просматривается необходимость систематизации данных о литических свойствах коммерческих бактериофагов.

Изучение литической активности вирионов и определение их титра проводится методами: Отто, Аппельмана, Грация, Л.М. Майской, М.О. Биргером и другими. Учитывая важность применения бактериофагов в лечебно-профилактической деятельности использование современного, высокотехнологического оборудования повысит точность определения литических свойств бактериофагов.

Таким образом, диссертационная работа Вакариной Арины Александровны, посвящена актуальной проблеме решения значимых вопросов, связанных со становлением, распространением и ликвидацией возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе ESCAPE патогенов.

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

В диссертационной работе впервые представлена доказательная база становления возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Анализ многолетних микробиологических исследований с изучением около 7000 бактериальных штаммов от пациентов акушерских стационаров и с

объектов производственной среды позволил определить перестройку популяций бактерий, основанную на антибиотикорезистентности микроорганизмов. Сопоставление результатов оценки устойчивости культур и показателей инфекционной заболеваемости определило локусы формирования штаммов, обладающих патогенным потенциалом: содержимое толстой кишки и кожа пупочного остатка.

Для включения в схемы лечения, профилактики инфекционных заболеваний выделены новые строго литические штаммы бактериофагов *Proteus mirabilis*, изученные методами полногеномного секвенирования.

Автором предложен и разработан методологический подход к исследованию влияния вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий *Staphylococcus aureus* и *P. mirabilis*, необходимый для обоснования возможности использования бактериофагов в комбинированной терапии. Имеются научные работы, касающиеся лечения антибиотиками в комбинации с бактериофагами, но не проводились исследования их взаимовлияния на уровне бактериальной клетки.

В работе представлен анализ чувствительности основных бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций к фагосодержащим лекарственным препаратам. Определено, что только 32 % бактерий рода *Klebsiella*, 40 % штаммов *Proteus spp.* было чувствительно к бактериофагам, для патогенной *Escherichia coli* O26 данное значение составило 25 %. Эти данные определяют направление для выделения новых штаммов бактериофагов и необходимость централизованного мониторинга литических свойств бактериофагов.

Получены данные о несоответствии количества устойчивых штаммов к бактериофагам при использовании методов на твердой и в жидкой питательных средах. Определены разночтения по пибактериофагу поливалентному в отношении штаммов *S. aureus* и по трём исследованным бактериофагам со штаммами *Klebsiella pneumoniae*.

Разработан и предложен метод оценки литических свойств бактериофагов в числовых значениях, исключающий субъективизм при выдаче заключения о

чувствительности бактерий к фагам. Рассчитано пороговое значение литической активности среды взаимодействия бактерий и бактериофага (0,045), допустимое для использования фагосодержащих препаратов. Показатель основан на высеве из каждой опытной ячейки, содержащей питательную среду, специфический бактериофаг, бактериальный изолят на плотный питательный агар, а также подсчете выросших колоний.

Сформулированные автором положения, выводы и практические рекомендации имеют научное обоснование и согласовываются с результатами проведенных исследований.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора на 2016 - 2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями», темы № 063 «Исследования микробиома человека при паразитарных и инфекционных заболеваниях» с регистрационным номером НИР №АААА-А-16-116022610094-2.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Выявление начального этапа активации процесса формирования возбудителей инфекций, связанные с оказанием медицинской помощи, послужит сигнальным моментом для развертывания дополнительных противоэпидемических мероприятий в лечебных учреждениях и недопущения вспышек инфекционных заболеваний. Определение кишечника как локуса обмена генетической информацией микробиоты и становления патогенных свойств бактериальных культур обеспечит точечный подход в процессе мониторинга, а, следовательно, гарантирует экономическую выгоду. Благодаря своевременной ротации антибактериальных препаратов, использованию вирулентных бактериофагов, в том числе предложенных автором (штаммы *Proteus phage* P16-2532 и 2207-№35, депонированные в NCBI GenBank под номерами MN840486.01

и MN840487.01) повысится уровень биологической безопасности пациентов при оказании медицинских услуг.

При изучении на клеточном уровне влияния антимикробных препаратов и бактериофагов определена возможность совместного применения различных форм лекарственных препаратов в схемах лечения пациентов. Кроме того, получено косвенное подтверждение правильности определения набора интеграз, обуславливающих умеренную природу бактериофагов.

Организация микробиологического мониторинга обеспечивает: анализ чувствительности основных возбудителей инфекционных заболеваний к фагосодержащим препаратам, необходимость управленческих мероприятий по обновлению баз маточных бактериофагов, целесообразность расширения объема исследований для уточнения данных, а также обмен информацией среди всех заинтересованных сторон.

Установленные различия результатов литической активности бактериофагов с использованием жидкой и плотной питательных сред будут способствовать разработке и созданию новых методов для определения чувствительности бактериальных штаммов к бактериофагам, что повысит точность результатов лабораторных исследований.

Предложенный, запатентованный способ оценки литической активности бактериофагов обеспечит исключение субъективизма при выдаче заключения о возможности применения бактериофагов и повышение достоверности определения литических свойств бактериофагов за счет применения оптических систем высокотехнологичного оборудования, это скажется на эффективности использования бактериофагов в лечебной и профилактической деятельности.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикаций в рецензируемых изданиях

Достоверность работы обеспечена прозрачностью и доступностью данных исследования в необходимом объеме, наличием подробной информации об источниках литературы для обоснования методологических подходов, используемых для экспериментальной части работы, сочетанием большого

спектра методов: бактериологических, серологических, вирусологических и молекулярно-генетических исследований с применением биоинформатического анализа. Статистическая обработка полученных результатов осуществлена с помощью программного обеспечения SPSS, разработанной для научных целей.

Способ оценки литической активности бактериофагов внедрен в работу бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, на кафедре микробиологии ГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области» для использования в практических целях, а также в учебно-образовательном процессе.

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.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные результаты диссертационной работы Вакариной А.А. могут быть применены в учебном процессе медицинских образовательных организаций, в постдипломном образовании при проведении теоретических и практических занятий, посвященных становлению инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и изучению литических особенностей бактериофагов. Кроме того, использование предложенного способа количественной оценки литической активности бактериофагов в практике обеспечит одновременное выполнение большого объема исследований по определению чувствительности бактерий к фагосодержащим препаратам, что обеспечит рациональную систему фаготерапии.

Соответствие специальности

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы,

сформированные автором, полностью соответствуют специальности: 1.5.11. – микробиология.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 рисунками и 37 таблицами. Работа представлена следующими структурными элементами: введение, основная часть, состоящая из четырех глав собственных разработок, заключение о выполненных исследованиях, перспективы дальнейшего изучения проблемы, связанной с применением бактериофагов как лекарственных препаратов, изложен список сокращений, литература, взятая за основу настоящего материала (228 источников, из которых 163 работы отечественных и 65 иностранных авторов).

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 законченным научным исследованием, содержащим важные вопросы и решения, касающиеся литических свойств бактериофагов, их применения при ликвидации значимых инфекций, в том числе, связанных с оказанием медицинской помощи. 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.

Результаты исследований Вакариной Арины Александровны обсуждены; отзыв на диссертацию одобрен на заседании Ученого совета ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 14 апреля 2022 года).

Отзыв составил:

Руководитель лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, д. 119, +7(863) 234-29-33, rostovniimp@rniimp.ru)

доктор медицинских наук


Анна Валентиновна Алешукина

Подпись А. В. Алешукиной заверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, д. 119, +7(863) 234-91-83, rostovniimp@rniimp.ru)

кандидат биологических наук


Наталья Владимировна Алексанина

