

«Утверждаю»

Директор ФБУН «НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера

член-корр. РАН, профессор

Жебрун А.Б.

2015 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы ВЕЧЕРКОВСКОЙ МАРИИ ФЁДОРОВНЫ на тему на тему: «Оценка микробиоты ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы выполненной работы

В настоящее время возникла ситуация, когда одновременно растёт потребность в научно-обоснованных свойствах бактерий, входящих в состав микробиоты человека и понимание степени её «неизученности», а также отсутствия возможности оперативно получать необходимую информацию для проведения адекватного лечения и профилактики различных заболеваний. Современные данные научных исследований указывают на значительную роль микробиоты в качестве важнейшего «органа» гомеостаза, влияющего на развитие человека, его физиологию и морфогенез. Микробиота ротовой полости является мало изученной областью по сравнению с микробиотой другой локализации. В работах последних лет показано, что известные заболевания людей, такие как диабет тип 2, пневмонии, атеросклероз и ряд других связаны с различными бактериями, локализованными в ротовой полости (десневой борозде слюне и др.). Развитие патологических процессов с участием бактерий ротовой полости

продолжается годами, что свидетельствует не только о необходимости получения данных о составе микробиоты, но и особенностях в разных возрастных группах. Микробиота детей с различными заболеваниями и, в частности, с онкогематологическими заболеваниями остается практически не изученной. Сравнительно недавно стало понятно, что многие трудности в выделении и культивировании бактерий микробиоты определяются их существованием в естественных экологических нишах в составе различных микробных сообществах и биопленках.

Совместное существование в составе микробиоты, продолжающееся длительное время, сделало большую часть бактерий взаимозависимыми. Большую проблему в клинической микробиологии представляют бактерии, не поддающиеся культивированию известными методами, отнесены к группе «пока не культивируемых». Изучение таких бактерий требует испытания большого числа разных условий культивирования, питательных сред, методов разделения с использованием физических и химических факторов. Такие исследования обязательно включают многократные контроли морфологии колоний и сообществ, морфологии бактериальных клеток при световой и электронной микроскопии, данных биохимического анализа, протеомного исследования, сиквенса отдельных генов и полных геномов, а также сравнение полученных результатов с существующими базами данных. Очевидно, что подобные исследования требуют определенной систематизации, которую может обеспечить только специализированная база данных.

Тема диссертации Вечерковской Марии Фёдоровны, посвященная изучению особенностей микробиоты ротовой полости у детей, страдающих онкогематологическими заболеваниями является важной и актуальной.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

Основу научной новизны результатов, полученных М.Ф. Вечерковской, составляет выявление существенных различий в микробиоте здоровых детей и детей с онкогематологическими заболеваниями. Показано, что микробиоты

больных детей характеризуются меньшим разнообразием культивируемых родов грамположительных и грамотрицательных бактерий и содержатся дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Важным для понимания организации жизни бактерий в организме человека следует считать выделение устойчивых и воспроизводимых при культивировании смешанных бактериальных сообществ, включающих культивируемые и пока не культивируемые бактерии. Несомненной заслугой автора является выделение в составе микробиоты слюны детей с онкогематологическими заболеваниями штамма, относящегося к роду *Streptococcus* нового (неизвестного) вида. Открытие нового вида *Streptococcus* стало результатом применения комплекса методов - изучение последовательностей гена, кодирующего 16S рРНК, материалов сиквенса полного генома штамма, гибридизации ДНК, а также анализа данных, полученных при изучения морфологии, биохимии, протеомного анализа.

Диссертантом впервые при изучении генома штамма нового вида стрептококков обнаружены различные гены, кодирующие факторы вирулентности (адгезины, гемолизины, белки-транспортеры, ассоциированные с множественной устойчивостью к антибиотикам), что позволяет отнести этот к патогенным для человека. Автором установлено, что в геноме штамма присутствует последовательность, идентичная гену, кодирующему бета-лактамазу класса А – широко распространенную во многих клинически значимых бактериях, возбудителях инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Аннотированный геном включен в базу NCBI № CP007628 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP007628.1>).

В результате проведенной работы автором разработана оригинальная электронная база данных «Microbes», которая позволяет хранить и систематизировать данные, получаемые в ходе экспериментов, проводить их анализ с помощью нового биоинформативного алгоритма. База запатентована и на неё получено свидетельство о государственной регистрации №2013620895 от 08 августа 2013г.

В целом, используемые материалы, примененные методы исследований, объем проведенных экспериментов обеспечивают выполнение поставленных перед диссертантом задач и научное обоснование выводов и рекомендаций. Выводы обоснованы и в целом вытекают из результатов проведенных исследований.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации.

В работе приведены результаты исследования 3,5 тысяч штаммов представителей различных родов аэробных и анаэробных бактерий. Основное внимание было уделено изучению микробных сообществ и методам выделения «чистых» культур бактерий, не поддающихся культивированию известными методами. Достоверность результатов исследования не вызывает сомнения, работа основана на большом объёме материала и современных методах сбора и обработки информации с использованием традиционных микробиологических, биохимических, молекулярно-биологических и биоинформативных методов исследования бактерий.

Полученные автором результаты работы были успешно реализованы на практике при изучении микробиоты ротовой полости детей с онкогематологическими заболеваниями. Быстрая идентификация бактерий с использованием метода MALDI-TOF спектрометрии, была использована в клинической практике лаборатории центра клинической микробиологии ПСПбГМУ им. ак. И.П. Павлова, что без сомнения позволило повысить качество и эффективность диагностики сложно идентифицируемых бактерий при лихорадках неясного генеза у пациентов с иммуносупрессией. Большое значение для науки и практики имеет выделение и идентификация нового неизвестного вида стрептококков, потенциально патогенного для детей с ослабленным иммунитетом, характеристика его генома, факторов вирулентности, чувствительности к антибактериальным препаратам.

Результаты диссертационной работы были и внедрены в педагогическую практику кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. ак. Д.К.Заболотного ПСПбГМУ им. ак. И.П. Павлова.

Несомненный научный интерес представляют данные исследований по филогенетическому анализу штамма VT 162, который показал эволюционные связи с близкородственными стрептококками возбудителями заболеваний человека различной локализации. Проверка и уточнение места данного штамма в систематике была проведена путем виртуальной ДНК-ДНК гибридизации с потенциально родственными бактериями. Полученные данные свидетельствуют, что по уровню сходства автору удалось выделить и описать неизвестный ранее вид стрептококков.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные автором результаты должны быть внедрены в повседневную практическую деятельность бактериологических лабораторий лечебно-профилактических медицинских учреждений, проводящих диагностические исследования микробиоты ротовой полости.

Данные о резистентности к антимикробным препаратам бактерий, представителей микробных сообществ микробиоты ротовой полости должны учитывать госпитальные эпидемиологи и клинические фармакологи в своей повседневной работе, при составлении формуляров лечения, а также при проведении профилактических и противоэпидемических мероприятий в стационарах.

Полученные результаты, изложенные в диссертационной работе, могут быть использованы: врачами терапевтами, педиатрами, хирургами, стоматологами, инфекционистами при лечении и профилактике заболеваний ротовой полости, вызванных грамотрицательными и грамположительными бактериями.

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при чтении лекций и проведения практических занятий по клинической

микробиологии, клинической фармакологии, педиатрии, онкологии в медицинских ВУЗах и на курсах повышения квалификации врачей.

В качестве замечаний следует отметить:

1. Рисунок № 1 и 2 имеют одинаковые названия.
2. В материалах и методах отсутствует методика определения чувствительности к хлоргексидину.
3. В работе встречаются устаревшие неудачные термины «микрофлора».
4. Таблица №8: Данные о чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) представлены суммарно для «Аэробных» и «Анаэробных» бактерий. В каждую из этих групп входят как грамположительные так и грамотрицательные бактерии. Таблица была бы более информативна, если бы результаты чувствительности к АМП были представлены отдельно для грамположительных и грамотрицательных бактерий, так как некоторые тестируемые АМП обладают узким спектром активности (клиндамицин, цефаклор, оксациллин, макролиды активны, в основном, только в отношении грамположительных бактерий).
5. Не понятно, какие критерии диссертант использовала при интерпретации результатов определения чувствительности (резистентности) к АМП, полученных для анаэробов? Так как автор в качестве основного метода определения чувствительности к АМП указывает диско-диффузионный?

Указанные замечания не снижают общей положительной оценки рецензируемой диссертации. Материал хорошо иллюстрирован, может служить основой для дальнейшего углубленного изучения микробных ассоциаций, резистентности к АМП бактерий микробиомы различных биотопов организма человека.

Результаты работы Вечерковской М.Ф., выносимые на защиту, обсуждены на Ученом Совете ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» 14 мая 2015 г. (протокол № 9). На основании проведенного обсуждения диссертации подготовлен настоящий отзыв.

Заключение

Диссертационная работа Вечерковской Марии Фёдоровны «Оценка микробиоты ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора В.В. Теца, и содержит новое решение актуальной научной проблемы изучения микробиоты ротовой полости здоровых и больных детей с выделением бактерий ранее неизвестного вида. По актуальности, новизне и практической значимости работа отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор - Вечерковская Мария Фёдоровна заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующая лаборатории кишечных инфекций
Федерального бюджетного учреждения науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский
Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера, доктор медицинских наук
197101, Санкт-Петербург, улица Мира 14.
Телефон (812) 2332092; факс (812) 232 92 17
E-mail: kaflidia@mail.ru



Кафтырева Л.А.

Подпись Кафтыревой Л.А. Заверяю:
Ученый секретарь ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера, к.м.н.



Грифонова Г.Ф.