

микроорганизмы – потенциальные возбудители заболеваний человека и животных (Бэер С. А., 2005; Штыкова Ю. П., 2013). Исследование закономерностей функционирования микропаразитоценоза позволит определить патогенетические механизмы воздействия паразита на организм хозяина. Изучение микропаразитоценоза с позиций молекулярно-генетических исследований в разрезе микробиологических аспектов важно для рациональной профилактики инфекций и инвазий, представляющих чрезвычайно актуальную проблему.

Снижение риска передачи кишечных патогенов должно опираться на своевременные профилактические мероприятия, основанные на оценке качества водных объектов и рыбной продукции по микробиологическим показателям. Для оптимизации биологической безопасности водных биотопов необходимо изучение их микробиоценоза, в частности, циркуляции бактерий рода *Aeromonas*. В развитии инфекции, связанной с *Aeromonas spp.*, опасность для человека представляют контаминированные аэромонадами рыбная продукция и вода (Хомякова Т. И., 2006; Канаева Т. И. и др., 2009; Janda J. M. et al., 2010; Камалов А. А. и др., 2015). Это обусловило характер исследований по обоснованию значимости бактерий рода *Aeromonas* в качестве санитарно-показательных микроорганизмов.

Вышеизложенное предопределило тематическую направленность исследований, раскрывающих механизмы межмикробного взаимодействия нормофлоры с УПМ толстой кишки при паразитарных инвазиях и изысканию новых подходов для дальнейших исследований по минимизации осложнений воспалительного характера после дегельминтизации пациентов.

Новизна, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертантом установлены особенности кишечного микробиоценоза пациентов с паразитарными инвазиями и инфекциями (описторхоз, лямблиоз, токсокароз, токсоплазмоз, иксодовый клещевой боррелиоз): при лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и иксодовом клещевом боррелиозе - выраженный дефицит бактерий рода *Lactobacillus*; при описторхозе – *Bifidobacterium spp.* Определены условно-патогенные бактерии, вызывающие снижение функции колонизационной резистентности нормофлоры толстой кишки: при описторхозе, лямблиозе, токсоплазмозе и токсокарозе - бактерии рода *Klebsiella*, при иксодовом клещевом боррелиозе - бактерии рода *Proteus*. Вторые позиции принадлежали бактериям *S. aureus* и грибам рода *Candida*.

Выявлены комплексы генов вирулентности и кластеры О- и Н-антигенов штаммов *E. coli*, изолированных из содержимого толстой кишки при инфекционно-инвазионном процессе, в зависимости от нозоформы. Показано влияние описторхозной инвазии на колонизацию организма человека штаммами

E. coli - носителями кластеров генов, ассоциированных с вирулентностью, что, возможно, связано с нарушением иммунитета и выраженным влиянием метаболитов *O. felineus*.

Разработана новая система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий, позволяющая определять наличие генетических детерминант штаммов: аэробактин *iuc*, гемолизин *hly*, колибактин *clb*, способствующих вероятности возникновения и развития инфекционных заболеваний (патент на изобретение РФ № 2662930 от 31.07.2018 «Система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий методом полимеразной цепной реакции»).

Установлено, что обнаружение бактерий рода *Aeromonas* в клиническом материале, видовое разнообразие, выделение в монокультуре и ассоциациях, резистентность к антибиотикам доказывает их этиологическую значимость в инфекционном процессе. Филогенетический сравнительный анализ белковых спектров клинических штаммов *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. veronii* с дендрограммами штаммов аналогичных видов, выделенных из объектов окружающей среды (вода, рыба), указывает на высокую степень гомологии, что свидетельствует об их близком родстве. Вследствие этого, воду и рыбу можно рассматривать как факторы передачи при аэромонадной инфекции, а бактерии рода *Aeromonas* - в качестве критерия микробиологической оценки водных объектов и рыбной продукции.

Предложен способ определения границ природных очагов биогельминтозов, дающий возможность применять генетические маркеры и показатели индекса подобия при выявлении локализации популяции карповых рыб в водных объектах для установления пределов распространения популяции рыб на конкретной территории (патент на изобретение РФ № 2545707 от 26.02.2015 «Способ определения границ природных очагов биогельминтозов»).

Разработан способ определения источника заражения при расшифровке вспышек бактериальных инфекций, позволяющий использовать кластерный анализ протеинограмм штаммов предполагаемых возбудителей, определять их идентичность и, тем самым, устанавливать принадлежность к одному источнику заражения (патент на изобретение РФ № 2696101 от 31.07.2019 «Способ расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения»).

Выделен мультирезистентный штамм бактерий *Acinetobacter baumannii*, результаты полногеномного секвенирования которого выявили маркеры резистентности к антимикробным препаратам: аминогликозидам (*aph(3)-Ib*; *aph(6)-Id*; *aph(3)-Ia*; *aph(3)-Via*; *argA*), бета-лактамам (*blaOXA-23*, *blaOXA-66*, *bla ADC-73*, *blaTEM-ID*), MLS-антибиотикам (*mrs*, *mph*), сульфонамиду (*sul2*), тетрациклину (*tet(B)*). Штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» В-8561 и международной базе данных GenBank/NCBI (accession no SRR8881948), а также

предложен для оценки эффективности антимикробных препаратов, дезинфицирующих средств (патент на изобретение РФ № 2711922 от 23.01.2020 «Мультирезистентный штамм бактерий *Acinetobacter baumannii* для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых антимикробных препаратов и дезинфицирующих средств»).

Полученные результаты, несомненно, имеют научную новизну.

Связь исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Катаевой Л.В. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках темы №060 «Исследование функционирования паразитарной системы описторхоза: микросимбиотические, популяционно-генетические аспекты, особенности при смене хозяев, антропопрессии» на 2016-2020гг., номер государственной регистрации АААА-А16-116022610096-6 от 26.02.2016г. Исследования проведены на оборудовании, имеющем сертификаты качества, свидетельства и аттестаты по метрологической поверке.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Разработаны теоретические основы оценки состояния микропаразитоценоза в звене промежуточных и окончательного хозяев *O. felineus* путем внедрения новых подходов к его дифференциации. На основе комплексной оценки сходства и различия состава микробиоценоза толстой кишки человека дана его характеристика при инфекционно-инвазионных заболеваниях. Выявлены качественные и количественные особенности микробиоты: на фоне снижения аутохтонных бактерий, выполняющих функцию колонизационной резистентности толстого кишечника, отмечено возрастание аллохтонных микроорганизмов. Полученные результаты, свидетельствующие о нарушении микробиоценоза толстой кишки, обосновывают включение пробиотических препаратов в схемы лечения пациентов с паразитозами.

Результаты исследований структуры микробиоценоза и сезонной динамики микробиоты моллюсков – первого промежуточного хозяина *O. felineus* - позволили выдвинуть и теоретически обосновать гипотезу о влиянии свойств персистенции резидентных бактерий на приживаемость яиц и дальнейшее развитие личиночных стадий гельминта в теле моллюска, что в итоге обуславливает устойчивое функционирование паразитарной системы.

Показана необходимость использования комплекса диагностических тестов при обследовании на наличие паразитарной инвазии, включающего исследование

микробиоценоза толстой кишки, определение чувствительности к антимикробным препаратам и бактериофагам (при обнаружении условно-патогенных бактерий). Это позволит провести коррекцию нарушений и будет способствовать профилактике воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных дегельминтизацией пациента.

Представляется целесообразным для идентификации видового разнообразия бактерии рода *Aeromonas* использовать метод масс-спектрометрии при проведении бактериологического исследования мочи, который будет способствовать улучшению диагностики возбудителей урогенитальной инфекции.

При расшифровке вспышек бактериальной инфекции и определении источника заражения определена необходимость проведения протеомного анализа подобия штаммов бактерий, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала.

Установлена контаминация бактериями рода *Aeromonas* объектов обитания (вода, придонный грунт) сочленов жизненного цикла *O. felineus* (моллюски, рыба). Определено превалирование этих бактерий в структуре микробиоты промежуточных хозяев *O. felineus*. Показано, что рыбы, инвазированные метацеркариями *O. felineus*, в большей степени подвержены обсеменению *Aeromonas spp.*, которые значительно снижают качество рыбной продукции. Эти исследования с высокой вероятностью доказывают необходимость доработки схем идентификации *Aeromonas spp.* и включения указанных бактерий в качестве критерия санитарно-гигиенической оценки объектов окружающей среды.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы 26 штаммов: 12 *E. coli*, изолированные из биоматериала пациентов с диагнозом описторхоз и лямблиоз, отличающиеся кластерами генов вирулентности и патогенности (В-8794, В-8789, В-8790, В-8791, В-8792, В-8793, В-8795, В-8796, В-8797, В-8798, В-8799, В-8800); 1 штамм *E. coli* В-8794, выделенный от пациента с лямблиозом, депонирован как референс-штамм нового генотипа для типирования бактерий рода *Escherichia*; 12 штаммов *Aeromonas spp.* (В-8815, В-8816, В-8817, В-8818, В-8819, В-8820, В-8821, В-8822, В-8823, В-8824, В-8825, В-8826), изолированные из воды открытых водоемов, рыб и клинического материала, отличающиеся резистентностью к антимикробным препаратам; 1 штамм *Acinetobacter baumannii* (В-8557) депонирован как природный штамм, обладающий генами резистентности к бета-лактамам – blaOXA-104 и ADC-30 и отсутствием маркеров резистентности к другим группам антибиотиков. Депонированные штаммы могут применяться для стандартизации оценки эффективности разрабатываемых перспективных антимикробных препаратов, а также в целях проведения филогенетических и молекулярно-генетических исследований.

В международном банке данных GenBank депонированы нуклеотидные последовательности 13 штаммов, носителей генов, ассоциированных с вирулентностью и резистентностью: *A. baumannii* (SRR8926368); *E. coli* (SRR11426061, SRR11426065, SRR11426066, SRR11426060, SRR11426067, SRR11426059, SRR11426064, SRR11426062, SRR11426068, SRR11426057, SRR11426058, SRR11426063), которые могут быть положены в основу разработки праймеров для создания диагностических наборов.

Сформирована рабочая коллекция штаммов, изолированных от пациентов с инфекционно-паразитарной патологией и объектов окружающей среды, которая может быть использована для изучения механизмов резистентности и штаммового разнообразия возбудителей бактериальных инфекций. Информация, содержащая сведения о локусе и месте выделения штаммов, составе и количественной характеристике, биологических свойствах, антибиотикорезистентности бактерий, включенных в рабочую коллекцию, оформлена в электронном виде (Excel).

Результаты исследований функционирования микропаразитоценозов при инфекционно-инвазионном процессе внедрены в образовательный процесс кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения от 29.01.2020 г.) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области» (акт внедрения от 15.01.2020 г.) как региональный компонент медицинской паразитологии. Материалы диссертации вошли в дополнительные образовательные программы повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей на базе ФБУЗ «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по специальности «Бактериология» (акт внедрения от 13.01.2020 г.) как региональный компонент медицинской паразитологии.

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации

Личный вклад автора состоит в участии во всех этапах выполнения диссертационной работы: в определении и формулировании цели и задач, сборе и анализе литературных источников, выборе методов исследования, проведении основного объема исследований.

Диагноз паразитарной инвазии на основании анамнеза, лабораторных исследований и объективных данных установлен заведующей клиникой ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора к.м.н., старшим научным сотрудником Степановой К. Б. Бактериологические исследования биоматериала и объектов окружающей среды проведены лично автором в бактериологической лаборатории ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, часть исследований - совместно с сотрудниками Карпухиной Н. Ф., Ташлановой В. В., Посоюзных О. В., Колотовой О. Н.

Паразитологические исследования на животных проведены лично автором на базе лаборатории эпидемиологического мониторинга природно-очаговых паразитозов ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, исследования рыб и моллюсков - совместно с сотрудниками этой лаборатории: д.б.н., главным научным сотрудником Беляевой М. И. и д.б.н., главным научным сотрудником Фаттаховым Р. Г.

Полногеномное секвенирование штаммов *E. coli* и *Acinetobacter baumannii*, депонирование штаммов *E. coli*, *Aeromonas spp.* и *A. baumannii* проводилось на базе отдела коллекционных культур Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора г. Оболенск совместно с заведующим отделом, к.б.н. Богуном А. Г. и к.б.н., старшим научным сотрудником Кисличкиной А. А.

Автором лично проанализированы все полученные результаты, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы, оформлены заявки на изобретения. Полученные данные обобщены в основных публикациях и докладах на научно-практических конференциях.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых журналах

Достоверность полученных результатов диссертационной работы не вызывает сомнений и подтверждается достаточным объемом исследований с применением комплекса современных инструментальных и лабораторных методов. Для выполнения поставленных задач были использованы микробиологические (бактериологические, биологические, масс-спектрометрические), молекулярно-генетические (полногеномное секвенирование, филогенетический анализ), паразитологические и статистические методы исследования.

Основные результаты диссертационной работы и ее научно-практическое значение достаточно полно отражены в опубликованных 46 печатных работах, из них 19 публикаций в изданиях, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК, 7 статей в других изданиях, 16 - в материалах конференций, 4 патентах на изобретения РФ, свидетельствах о депонировании штаммов в Государственной коллекции. Результаты исследования доложены на 12 научно-практических конференциях международного, всероссийского и регионального уровней.

Таким образом, основные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные автором, являются научно-обоснованными и достоверными.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Комплекс диагностических тестов при обследовании на наличие паразитарной инвазии должен включать исследования микробиоценоза толстой кишки, результаты которого позволят провести коррекцию нарушений и профилактику воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных дегельминтизацией пациента.

Схемы лечения паразитарных инвазий должны содержать назначения пробиотиков на основе *Bifidobacterium spp.* при описторхозе; бактерий рода *Lactobacillus* - лямблиозе, токсоплазмозе, токсокарозе и искодовом клещевом боррелиозе.

Контаминация карповых видов рыб, являющихся вторым промежуточным хозяином *O.felineus*, бактериями семейств *Enterobacteriaceae* и *Aeromonadaceae*, может свидетельствовать об инвазированности рыб личинками паразита и влиять на микробиологические и паразитологические показатели при оценке качества рыбной продукции.

Представляется целесообразным для идентификации видового разнообразия бактерий рода *Aeromonas* использовать метод масс-спектрометрии при проведении бактериологического исследования мочи с целью улучшения диагностики урогенитальной инфекции.

С целью расшифровки вспышек бактериальных инфекций и определения источника заражения рекомендовано проведение протеомного анализа подобия штаммов бактерий, изолированных из различных объектов окружающей среды и клинического материала.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация выполнена по специальностям 03.02.03 –микробиология, 03.02.11 – паразитология. Построена по традиционной форме. Структура работы стандартная и соответствует ГОСТ Р 7.0. 11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Диссертация изложена на 256 страницах компьютерной верстки, состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Библиографический указатель включает 313 источников: 193 отечественных и 120 зарубежных. Текст иллюстрирован 28 таблицами и 46 рисунками, приложениями.

Текст автореферата в полной мере отражает краткое содержание диссертационной работы. По объему, структуре и содержанию соответствует требованиям ВАК РФ.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет, но имеется ряд вопросов к ее автору.

Вопросы:

1. При анализе качественно-количественных изменений интестинальной микрофлоры не очень понятна количественная степень нарушений. Так в фразе: «Характеризуя состав нормофлоры толстой кишки необходимо отметить, что при описторхозной инвазии **очень выражен дефицит** бактерий рода *Bifidobacterium* – у $72,3 \pm 4,3$ % больных. Дефицит бактерий рода *Lactobacillus* определен у $67,6 \pm 4,7$ % больных. Содержание бактерий рода *Enterococcus* ниже нормы зарегистрировано у $30,4 \pm 6,9$ % больных, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью – у $31,1 \pm 6,8$ % больных описторхозом». По нашему мнению, общепринятые обозначения в Ig КоЕ/г здесь были бы уместны. В пояснениях к отраслевому стандарту (2003) В.М.Бондаренко с соавт. писал, что кроме отраслевого стандарта, представляющего статистические нормы в целом по стране, есть еще нормы региональные, которые необходимо учитывать при анализах микрофлоры кишечника. Тем более автор предлагает заниматься коррекцией затем состояний при паразитозах с применением пробиотиков. Использовали ли в схемах лечения паразитозов пробиотики и какие результаты были получены?

2. Модель совместного культивирования *K.pneumoniae*, *S.aureus* и мариит описторхов показывает отдельно взятые виды бактерий и их совместное пребывание в ограниченной питательной среде. Параметры взаимоотношений бактерий ограничиваются оценкой снижения жизнеспособности фигурантов во время их совместного пребывания. При этом патогенность микроорганизмов никак не изменилась. Почему? Не является ли снижение жизнеспособности фигурантов системы естественным при снижении питательной основы среды обитания? И что подразумевается под «экзометаболитами» у трематод? Чтобы доказать влияние этих продуктов жизнедеятельности целесообразно было бы получить перед экспериментом эти самые «экзометаболиты» мариит описторхов в чистом виде (если это возможно) и уже в их присутствии культивировать бактерии. Остается открытым вопрос о возможности поддерживать марииты описторхов в жизнеспособном состоянии на среде 199 даже в течение 10 дней.

3. В эксперименте была использована ингибиторная среда Левина, которая предназначена для выделения из биологического материала грамотрицательных энтеробактерий, и способна угнетать рост грамположительных бактерий (в т.ч. золотистых стафилококков). При этом сделано заключение «Таким образом, можно предположить, что в эксперименте *in vitro* при совместном культивировании экзометаболиты мариит описторхов оказывают ингибирующее влияние на рост и размножение условно-патогенных бактерий, в частности *K. pneumoniae* и *S. aureus*, причем патогенных *S. aureus* в большей степени. Вероятно, это может быть связано на первоначальном этапе с конкуренцией за питание, а также воздействием продуктов обмена мариит на функционирование

микробактерий», что ничем не подтверждено. А угнетение роста золотистых стафилококков по сравнению с клебсиеллами было предсказуемо из-за использования для контрольных высевов среды Левина. Не объяснен автором выбор *S.aureus* в качестве 2-го фигуранта в эксперименте *in vitro*. *S.aureus* не является симбиотическим микроорганизмом кишечника (Это патогенный микроорганизм и в кишечнике - транзиторный обитатель). Логичнее было бы использование в модели условно-патогенных стафилококков.

В целом работа заслуживает положительной оценки.

Заключение

Таким образом, диссертация Любови Владимировны Катаевой на тему: «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗА ПРИ ИНФЕКЦИОННО-ИНВАЗИОННОМ ПРОЦЕССЕ», представленная на соискание учёной степени доктора медицинских наук является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований, а также теоретических и научно-практических разработок осуществлено решение актуальной научной проблемы по установлению микробиологических закономерностей функционирования микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе на модели изучения межпопуляционных взаимодействий условно-патогенных бактерий и сочленов жизненного цикла *O. felineus*, имеющих принципиальное значение для реабилитации больных паразитарными инвазиями и инфекциями.

Диссертационная работа Любови Владимировны Катаевой «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МИКРОПАРАЗИТОЦЕНОЗА ПРИ ИНФЕКЦИОННО-ИНВАЗИОННОМ ПРОЦЕССЕ», представленная на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03-микробиология, 03.02.11-паразитология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объёму проведенных исследований соответствует критериям, установленным п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года №335, от 02 августа 2016 года №748, от 29 мая 2017 года №650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 01 октября 2018 года №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор – Катаева Любовь Владимировна заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 03.02.11 - паразитология.

Отзыв на диссертационную работу Катаевой Любови Владимировны заслушан, обсужден и утвержден на заседании Ученого Совета Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, протокол № 10 от «28» декабря 2020 года.

Заведующая лабораторией вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
доктор медицинских наук,



Алешукина Анна Валентиновна

Адрес: 344000, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный д. 119/262/157

Тел.: +7 (863) 234-91-83

E-mail: niicrodouble@yandex.ru

Подпись доктора медицинских наук Алешукиной Анны Валентиновны 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,
кандидат биологических наук,



Алексанина Наталья Владимировна

10 февраля 2021 г.