

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Д.м.н., профессор, заслуженный врач
Российской Федерации



Е.И. Ефимов

«16» ноября 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы Детушевой Елены Владимировны на тему: «Моделирование биопленки у бактерий на плотной питательной среде и изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность избранной темы исследования. Медицинская микробиология и клиническая иммунология, на современном этапе переживают бурный период в своем развитии. Генетические основы патогенеза и вирулентности, изменчивость патогена в ходе инфекционного

процесса, специфические отношения микро- и макроорганизмов на молекулярном, клеточном и органном уровнях служат объектом интенсивных исследований, приносят ценную информацию о механизмах агрессии патогенов и защиты человека.

Одной из проблем современной инфектологии является изучение эволюционно сформировавшихся у бактерий оптимальных механизмов, позволяющих им ускользать от надзорных иммунорегуляторных функций макроорганизма путем блокирования процесса распознавания бактериальных антигенов. Одним из существенных факторов в этом аспекте является феномен пленкообразования не только у патогенных, но и условно-патогенных биоагентов.

Хорошо известно, что биопленка - живое, постоянно обновляющееся сообщество одного или нескольких видов бактерий, которое закрепилось на биогенном субстрате и окружено матриксом, предохраняющим микроорганизмы от воздействия элементов окружающей среды, в том числе и лекарственных препаратов. Данное обстоятельство во многом определяет степень биодоступности к возбудителям инфекционных заболеваний антибиотиков, антисептиков и дезинфектантов.

Исследования последних лет свидетельствуют, что пленкообразующей способностью обладают штаммы не только патогенных, но и условно-патогенных возбудителей, широко циркулирующих в лечебных стационарах хирургического профиля, родильных домах и др. Как следствие, они играют доминирующую роль в возникновении нозокомиальных (госпитальных) инфекций именуемых сегодня как инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Наличие механизмов биопленкообразования у госпитальных экovarов определяет их высокую устойчивость к антибиотикам, что, в конечном итоге, ухудшает прогноз течения гнойной инфекции. Эти обстоятельства, по-видимому, определяют высокую регистрируемость ИСМП в РФ (официально ежегодно около 25-30 тысяч случаев, однако в реальности не менее 2-2,5 млн).

В связи с вышеизложенным, исследования, посвященные изучению роли антибиотических лечебных препаратов, антисептиков, дезинфектантов в формировании механизмов резистентности к ним у госпитальных биоагентов, и в частности, о вкладе биопленок в этот процесс являются своевременными и актуальными. Автор четко обозначил цель своей диссертационной работы – моделирование биопленок у представителей госпитальных патогенов для изучения их чувствительности к антисептикам, а также изучение молекулярно-генетических механизмов устойчивости к триклозану у актуального госпитального патогена *Staphylococcus aureus*. Задачи исследования сформулированы четко, полностью отражают структуру диссертационного исследования и достаточны для достижения поставленной цели.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации.

В представленной диссертационной работе проанализирована возможность моделирования биопленкообразования у бактерий при их культивировании на плотных питательных средах на примере госпитальных и референс-штаммов видов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Автором на микроскопическом уровне выявлены особенности морфологии бактериального газона, аналогичные структурам биопленок и макроколоний, на примере штамма *A. baumannii* В-1745.

В ходе диссертационного исследования разработан трехэтапный метод, позволяющий оценить степень эффективности антисептического препарата против возбудителей бактериальных инфекций, находящихся как в виде планктонной культуры, так и в форме биопленки. В результате проведенной работы автором установлено, что антисептик хлоргексидин эффективен против антибиотикорезистентных госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* в концентрации 1,5 %, что

значительно отличается от концентрации (0,5 %), рекомендованной инструкцией по применению данного антисептика.

В рамках диссертационной работы получены два мутантных варианта штамма *S. aureus* ATCC25923, устойчивых к 64 мг/л антисептика триклозана при длительном выращивании в условиях селективного давления данного антисептика. У данных мутантных штаммов выявлены точечные мутации в гене еноил-ацил-редуктазы *fabI*, а также в других генах, ассоциированных со структурами клеточной стенки и клеточным транспортом. Названные мутации стабильно наследовались и не утрачивались при длительном культивировании бактерий в отсутствие селективного давления триклозана.

На основании вышесказанного считаем, что научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, является несомненной.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

В ходе проведенного Детушевой Е.В. исследования создана и охарактеризована рабочая коллекция штаммов госпитальных патогенов для использования в качестве референс-штаммов при изучении процессов биопленкообразования и формирования устойчивости к антисептикам, которая может быть использована другими исследователями. Автором разработан трехэтапный метод сравнительной оценки чувствительности планктонных клеток бактерий и биопленок к антисептикам, описанный в Методических рекомендациях учрежденческого уровня (Оболенск, 2016).

Важным результатом исследования явилось определение эффективной концентрации антисептика хлоргексидина (1,5 %), использование которой в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации в г. Москве позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов - возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции

легких. Последнее подтверждается Актом внедрения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко №1 от 06.04.2016 г.

Детушевой Е.В. депонированы четыре авторских мутантных штамма *S. aureus* Tr1, *S. aureus* Tr2, *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», которые могут быть использованы в дальнейших исследованиях молекулярных механизмов устойчивости к триклозану, что соответствует федеральному уровню внедрения и подтверждается четырьмя справками о депонировании от 18 марта и 27 мая 2016 г.

Автором депонированы также две последовательности ДНК мутантных генов *fabI* из штаммов *S. aureus* ATCC25923-Tr1 и ATCC25923-Tr2, устойчивых к триклозану, в международную базу данных GenBank, что является мировым уровнем внедрения результатов диссертации.

Личный вклад автора.

Анализ диссертационной работы Детушевой Е.В. показывает, что автор самостоятельно получила подавляющую часть результатов, изложенных в диссертации. Под руководством к.б.н. Фурсовой Н.К. и при консультативной помощи д.м.н., профессора, академика РАН Дятлова И.А., а также при сотрудничестве с рядом коллег из ФБУН ГНЦ ПМБ, автор провела все работы, начиная с планирования экспериментов и заканчивая получением результатов и их анализом. Полностью самостоятельно ею выполнены основные этапы исследований: определение антибактериальной активности антисептиков, моделирование биопленок на поверхности плотных питательных сред, селекция устойчивых к триклозану клонов штамма *S. aureus* ATCC25923, статистическая обработка полученных данных и их интерпретация, подготовка материалов к опубликованию. Все изложенные в диссертации материалы получены непосредственно самим соискателем или при его участии.

Общая характеристика диссертационной работы.

Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, две главы собственных исследований, заключение, выводы, четыре приложения и список цитируемых источников, включающий 287 ссылок, в том числе 37 отечественных и 250 зарубежных публикаций. Работа иллюстрирована 11 рисунками и 3 таблицами.

Во Введении автор раскрывает актуальность проблемы, четко формулирует цель и задачи, отражает научную новизну работы, формулирует основные положения, выносимые на защиту, определяет научную и практическую значимость полученных результатов.

В описании материалов и методов исследования дана подробная информация об объектах исследования, достаточно раскрыты использованные материалы, оригинальные, модифицированные методы исследования, приведены сведения о нормативно-технических, нормативно-методических и других документах (методических указаниях, руководствах), согласно которым проводились исследования, данные об использованных наборах реагентов, программного обеспечения. Приведена информация о методах математической и статистической обработки результатов.

Обзор литературы представляет собой развернутый, квалифицированный, достаточно полный анализ публикаций, дающих полное представление о взаимосвязи бактериальных инфекций, возникающих при оказании медицинской помощи с формированием в пораженном организме биопленок микроорганизмов, а также об изучении функциональных, биохимических, морфологических и иных свойств биопленок и механизмов возникновения устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам.

В главе «Оценка чувствительности планктонных клеток и биопленок госпитальных штаммов бактерий к антисептику хлоргексидину» описана разработка трехэтапного метода сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам. Предложенный для

оценки эффективности биоцидов метод является экспериментальным приемом, моделирующим биопленку бактерий на поверхности плотной питательной среды. При помощи разработанного метода изучена антибактериальная активность хлоргексидина в отношении клинических изолятов и референс-штаммов видов *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* и *S. aureus*. Показано, что планктонные клетки нозокомиальных патогенов существенно более чувствительны к хлоргексидину, чем бактериальные клетки тех же штаммов в составе биопленки. Наличие структур, характерных для биопленок, у семидневных бактериальных культур подтверждено результатами атомно-силовой и электронной микроскопии, а также MALDI-анализа, на примере клинического штамма *A. baumannii* В-1745. В результате проведенного исследования установлено, что концентрация хлоргексидина, рекомендованная в инструкции по применению для использования в качестве антисептика для обработки рук (0,5%), недостаточна для инактивации современных штаммов госпитальных патогенов и предложено использование более высокой концентрации – 1,5%.

Глава «Изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану у *Staphylococcus aureus*» посвящена изучению механизмов возникновения устойчивости к триклозану у стафилококков. В ходе проведенной работы, с помощью культивирования штамма *S. aureus* ATCC25923 в условиях селективного давления ступенчатых концентраций триклозана, получены два варианта триклозан-устойчивых мутантных штаммов, которые резистентны к данному антисептику в концентрации 64 мг/л, что превышает уровень чувствительности исходного штамма в 128 раз. Показано, что приобретенная устойчивость к триклозану стабильно наследовалась данными мутантными штаммами при длительном культивировании, в течение 26 месяцев, в отсутствии селективного давления. Выявленным молекулярным механизмом триклозан-устойчивости двух независимо полученных мутантных штаммов является мутация в гене *fabI*, кодирующим еноил-ацил-

редуктазу - фермент, участвующий в синтезе жирных кислот стафилококков. Дополнительно описаны еще по две стабильно наследуемые без селективного давления мутации: в штамме *S. aureus* Tr1- в гене гипотетического транспортного белка и в гене белка-антипортера, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочам; в штамме *S. aureus* Tr2 – мутация в гене мембранного белка и в гене гистидин-киназы. По-видимому, выявленные стабильно наследующиеся без селективного давления триклозана мутационные изменения в геномах триклозан-устойчивых вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 обеспечили высокий уровень устойчивости к триклозану.

В главе «Заключение» подведен итог, значительной по объему, проделанной работы, корректно обобщены и детально проанализированы полученные данные.

Диссертация написана в хорошем литературном стиле, убедительно аргументирована, читается с интересом, дополнена качественным иллюстративным материалом, который не только информативен, но и убедительно корреспондируется с излагаемым материалом.

Выводы, представленные автором, отражают результаты собственного исследования и соответствуют поставленным перед исследователем задачам.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствует специальности 03.02.03-микробиология.

Автореферат диссертации построен по классическому принципу, четко, достоверно и в достаточной степени отражает все ключевые характеристики диссертационной работы, содержание ее разделов и степень участия соискателя в их выполнении.

По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 3 статьи в реферируемых журналах и 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских конференций.

Замечания к диссертационной работе.

Принципиальных замечаний к материалам диссертации Детушевой Е.В. нет.

Однако, на обсуждение, по существу диссертационной работы, предложены следующие вопросы:

1. В тексте автореферата утверждается, что показана адекватность подхода моделирования бактериальных биопленок на поверхности плотной питательной среды, однако не указывается степень адекватности предложенной модели реальному процессу биопленкообразования у *A.baumannii* В-1745.

2. Не обоснован выбор конкретного значения более высокой концентрации хлоргексидина. Почему она была увеличена именно в 3,0 раза?

3. Чем обусловлен выбор классов и видов биоцидных препаратов, использованных в исследовании?

4. На основании каких критериев основано утверждение автора об эффективности противоэпидемических мероприятий при использовании 1,5% р-ра хлоргексидина?

Заключение

Диссертация Детушевой Елены Владимировны на тему: «Моделирование биопленки у бактерий на плотной питательной среде и изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология», выполненная при консультировании академика РАН доктора медицинских наук профессора Дятлова Ивана Алексеевича является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена научная задача: показана принципиальная возможность моделирования бактериальной биопленки на плотных питательных средах, изучен молекулярно-генетический механизм

