

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Детушевой Елены Владимировны

**на тему «Моделирование биопленки у бактерий на плотной питательной среде
и изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану»**

по специальности 03.02.03 – «микробиология»

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Актуальность избранной темы. Одной из крупных проблем современного здравоохранения во всем мире является неуклонный рост числа нозокомиальных инфекций. В настоящее время нет ни одного стационара, в котором не отмечались бы случаи инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. В России заболеваемость ими составляет 1 на 1000 пациентов, в то время как в США она равна 50, в Испании – 100, а в Швеции – 117. Эти на первый взгляд утешительные цифры в отношении России скорее говорят о недостаточной регистрации случаев и огромной предстоящей работе в этом направлении. Так, экономический ущерб от нозокомиальных инфекций в России составляет 5 миллиардов рублей, что сопоставимо со всеми годовыми расходами на крупный регион.

Первым средством борьбы с возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, являются биоциды: дезинфектанты и антисептики. Только в нашей стране зарегистрировано более 600 химических дезинфицирующих средств и технологий. Однако, наряду с развитием резистентности микроорганизмов к антибиотикам, отмечается нарастающая устойчивость возбудителей нозокомиальных инфекций к антисептикам и дезинфектантам. Большую роль в этом процессе играет способность бактерий формировать биопленки как в организме человека, так и на предметах внутрибольничной среды. Как известно, в составе микробных биопленок бактерии меняют свои биологические свойства, в том числе отношение к биоцидам. При этом использование ранее применяемых антисептиков и дезинфектантов становится невозможным из-за утраты их эффективности. В настоящее время, несмотря на большой объем информации, существует пробел в знаниях о динамике формирования устойчивости штаммов бактерий к биоцидным препаратам, в том числе на молекулярном уровне.

Поэтому выбранная Еленой Владимировной тема диссертационного исследования крайне важна и своевременна как для пополнения теоретических знаний о ме-

ханизмах формирования биопленок и развитии устойчивости штаммов к антисептикам и дезинфектантам, так и для использования их в профилактической медицине.

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

Положения и выводы диссертационной работы обоснованы полностью раскрытой целью научного исследования и выполненными задачами, поставленными для ее достижения. Для правильного выбора цели исследования автором диссертационной работы проанализирован достаточный объем источников литературы (всего 287: 37 отечественных, 250 зарубежных). Все данные, полученные в ходе выполнения задач исследования, подвергнуты глубокому теоретическому анализу с учетом уже имеющихся знаний в сфере научных интересов автора. Положения, выносимые на защиту, и полученные выводы имеют логическое подтверждение в тексте и хорошо иллюстрированы таблицами и рисунками. Каждое положение и вывод имеют смысловое и фактическое обоснование и логично связаны между собой единой целью исследования.

Практические рекомендации описаны в соответствующем разделе работы. Они выполнимы и могут быть использованы специалистами учреждений различного профиля: научного и диагностического. Один из пунктов рекомендаций об использовании 1,5%-ного раствора хлоргексидина при уходе за пациентами уже выполняется и демонстрирует положительный эффект.

Достоверность и новизна полученных результатов. Достоверность полученных результатов основана на большом объеме проведенных исследований, выполненных на высоком методическом уровне. Так, в работе были использованы штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, выделенные от пациентов нейрореанимации, и референс-штаммы, рекомендованные Научно-исследовательским институтом дезинфектологии Роспотребнадзора для оценки активности дезинфектантов и антисептиков, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск».

При проведении исследований были использованы препараты антисептиков: «Дезин» - 20 %-ный водный раствор хлоргексидина (ООО Дезиндустрия, Россия), и триклозан - (Sigma-Aldrich Chemie, Германия).

Соискателем использован целый ряд классических и современных методов исследования: бактериологических, биофизических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических, характеризующихся высокой специфичностью и чувствительностью. Некоторые методы в ходе выполнения работы были усовершенствованы в русле выполнения исследовательских задач.

Все полученные автором результаты статистически обработаны с помощью современных компьютерных программ, выбор метода обработки соответствовал объему и формату проведенных исследований. Положения и выводы основаны на достоверных статистических данных.

Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов.

Теоретическая значимость результатов исследования заключается в следующем:

- Впервые показана возможность моделирования биопленкообразования у бактерий при культивировании на плотных питательных средах, которая основана на анализе чувствительности к антибактериальным препаратам госпитальных и референс-штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *E. coli* и *S. aureus* при разных условиях культивирования.
- Определено, что антисептик хлоргексидин эффективен против антибиотикорезистентных госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* в концентрации 1,5 %, в отличие от концентрации 0,05 %, рекомендованной инструкцией по применению.
- Впервые в условиях селективного давления в течение 40 суток получены два мутантных штамма *S. aureus* ATCC25923 – *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2, устойчивых к 64 мг/л триклозана, характеризующихся наличием точечных мутаций в гене еноил-ацил-редуктазы *fabI* и в других генах, ассоциированных со структурами клеточной стенки и клеточным транспортом, приводящим к формированию устойчивости к триклозану.

Практическая значимость результатов исследования заключается в следующем:

- Создана и охарактеризована рабочая коллекция штаммов госпитальных патогенов для использования в качестве референс-штаммов при изучении процессов биопленкообразования и формирования устойчивости к антисептикам.

- Разработан трехэтапный метод оценки чувствительности планктонных клеток и биопленок микроорганизмов к антисептикам (Методические рекомендации, Оболенск, 2016).
- Внедренная к использованию в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации концентрация хлоргексидина (1,5 %) позволила уменьшить интенсивность циркуляции патогенов - возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (Акт внедрения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко №1 от 06.04.2016).
- В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы четыре мутантных штамма *S. aureus* Tr1, *S. aureus* Tr2, *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C, устойчивых к высоким концентрациям триклозана (Справки о депонировании № 15 и № 16 от 18 марта 2016 г.; № 35 и № 36 от 27 мая 2016).
- В международной базе данных GenBank депонированы две последовательности мутантных генов *fabI*, кодирующих фермент еноил-ацил-редуктазу в штаммах *S. aureus* ATCC25923-Tr1 и ATCC25923-Tr2, устойчивых к триклозану (GenBank KP100447 и KP100446).

Оценка содержания диссертации, её завершенность. Материалы диссертационной работы изложены на 157 страницах печатного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных исследований, отраженных в 2-х главах, заключения, выводов, практических рекомендаций, 4-х приложений и списка цитируемой литературы из 287-ми источников. Работа иллюстрирована 3-мя таблицами и 11-ю рисунками. Каждый раздел диссертации логично перетекает в следующий. Диссертация хорошо оформлена, имеет четкий, лаконичный научный стиль. Таблицы и рисунки наглядно представляют результаты и их анализ. Все поставленные автором задачи выполнены в полном объеме.

По теме диссертации опубликовано всего 11 научных работ, из них – 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, и 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских конференций. В публикациях содержится полный объем информации, касающейся темы диссертации.

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации. Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». М.: Стандартинформ. – 2012. Диссертация и автореферат Елены Владимировны соответствует всем правилам написания и оформления соответствующих научных работ, установленным в нормативных документах.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

- 1) Неоспоримым дополнительным достоинством диссертации Елены Владимировны является то, что эта работа предопределяет возможность появления целого направления научно-исследовательской работы, связанного с практическим использованием результатов исследований. Так, пополнение и регистрация базы белковых масс-спектров планктонных культур и биопленок штаммов - возбудителей нозокомиальных инфекций позволит своевременно выявлять биопленочные штаммы, выделенные от больных, с помощью масс-спектрометрического анализа. В то же время предложенный в результате исследовательской работы метод определения чувствительности указанных биопленочных штаммов может быть использован для быстрой коррекции схемы дезинфекции и антисептических мероприятий в этом стационаре.
- 2) Выявленные при масс-спектрометрическом анализе характерные для биопленочных культур белки могут служить мишенями при разработке новых биоцидных препаратов.
- 3) Установленный механизм защиты штаммов *S. aureus* от триклозана в виде мутаций позволит разработчикам биоцидных препаратов учесть эти сведения и сконструировать защитные механизмы для проникновения разрабатываемого препарата в бактериальную клетку до начала активации ферментного комплекса микроорганизма.

Недостатки в содержании и оформлении диссертации не выявлены.

Вопросы для дискуссии:

1. Какой метод оценки чувствительности штаммов бактерий к антисептикам Вы рекомендуете для практического использования: метод микрокапли или аппликативный метод?
2. Не считаете ли Вы, что использование 1,5 % раствора хлоргексидина, вместо 0,5%, для обработки кожи и слизистых у стационарных больных может вызывать побочные нежелательные эффекты: в отношении пациентов – сухость кожи, гиперчувствительность, дерматиты, а в отношении микроорганизма – селекцию штаммов, устойчивых и к этой концентрации препарата?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным «Положение о присуждении ученых степеней» по пунктам:

10) Диссертация написана автором самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Личный вклад автора в работу составляет более 80%.

11) Основные научные результаты диссертации опубликованы в 3-х рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, в методических рекомендациях о трехэтапном методе оценки чувствительности планктонных клеток и биопленок микроорганизмов к антисептикам (Оболенск, 2016); имеются справки о депонировании в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» четырех мутантных штаммов *S. aureus* Tr1, *S. aureus* Tr2, *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C, устойчивых к высоким концентрациям триклозана; имеются сведения о депонировании в международной базе данных GenBank двух последовательностей мутантных генов *fabI*, кодирующих фермент еноил-ацил-редуктазу в штаммах *S. aureus* ATCC25923-Tr1 и ATCC25923-Tr2, устойчивых к триклозану (GenBank KP100447 и KP100446).

14) При использовании методик или полученных ранее отдельных результатов автор диссертации ссылается на автора и источник заимствования материалов.

З а к л ю ч е н и е:

Диссертация Детушевой Елены Владимировны на тему: «Моделирование биопленки у бактерий на плотной питательной среде и изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану», выполненная под руководством кандидата

биологических наук Фурсовой Надежды Константиновны и консультанта академика РАН, доктора медицинских наук, профессора Дятлова Ивана Алексеевича,

представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 — «микробиология», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи — изучение чувствительности госпитальных штаммов к антисептикам путем моделирования биопленок и определение молекулярно-генетических механизмов устойчивости *S.aureus* к триклозану, имеющей существенное значение для соответствующей отрасли знаний, а именно: разработан трехэтапный метод сравнительной оценки чувствительности к антисептикам бактериальных планктонных и биопленочных культур, показавший что чувствительность к хлоргексидину у госпитальных штаммов бактерий в составе биопленки существенно ниже, чем в планктонной форме; получены мутантные варианты штамма *S.aureus*, охарактеризованные с помощью современных молекулярно-генетических методов, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24. 09. 2013 г., с изменениями, утвержденными постановлением Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Официальный оппонент,
 Краева Людмила Александровна,
 доктор медицинских наук, 03.02.03 – «микробиология»,
 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14,
 тел. 7 (812) 498 09 39, 7 (904) 610 21 54,
lykraeva@yandex.ru
 ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии
 имени Пастера Роспотребнадзора,
 заведующая лабораторией
 медицинской бактериологии
 28.11.2016.

Л.А. Краева

Подпись Л.А.Краевой удостоверяю

Начальник отдела кадров



С.Н. Михайлова