

Отзыв

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук ШУБНИКОВОЙ ЕЛЕНЫ ВЛАДИМИРОВНЫ
«ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И ФОРМ
АДАПТИВНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ
ПРЕПАРАТАМ» 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы. Мелиоидоз эндемичен для стран Юго-Восточной Азии где он регистрируется у человека и животных. Имеются сообщения о единичных случаях заболевания в Индии, Индонезии, Борнео, Филиппинах, Шри Ланке,, Турции, Иране. В странах Европы и в США все случаи мелиоидоза являются завозными. Так, в США с 1973 г. было зарегистрировано 343 случая мелиоидоза при этом умерло 36 человек. В эндемичных по мелиоидозу регионах основным резервуаром возбудителя в природе являются почва и вода. В этих районах возбудитель может быть выделен из почвы, стоячих водоемов, прудов, рисовых плантаций. Аналогичная ситуация в мире и по сапу. Так, за период 1959—1967 гг. в мире зарегистрировано 1146 вспышек и 1590 отдельных случаев сапа, из которых на Азию приходилось 98,2 % вспышек и 100 % спорадических случаев. В последнее время сап встречается в таких странах, как Турция, Сирия, Иран, Пакистан, Ирак, Таиланд, КНР, Индонезия, Монголия. Эти факты позволяют рассматривать сап и мелиоидоз, как потенциальные «возвращающиеся патогены», которые при определенных условиях могут вызвать серьезные вспышки и представлять угрозу общественному здравоохранению.

Возрастающий поток туристов, рост торгового оборота с государствами Азии неблагоприятными по сапу и мелиоидозу делает

вероятным занос возбудителя в нашу страну. Совершенно очевидно, что общественное здравоохранение должно быть готово к ликвидации этой потенциальной угрозы. Важнейшее место среди комплекса мероприятий принадлежит проведению быстрой и адекватной антибактериальной терапии.

Однако в настоящее время мировое сообщество столкнулось с ситуацией, когда новые антимикробные препараты появляются крайне редко, в то время как эффективность существующих и широко используемых антибиотиков неуклонно снижается. Одна из причин это нерациональное и не вполне обоснованное применение антибиотиков.

Более того, в последнее время в результате фундаментальных исследований установлен комплексный характер взаимодействия микроорганизма с химиопрепаратами в условиях *in vivo*, обусловливаемый формированием биопленки, внутриклеточной персистенцией и, наконец, прямым воздействием на антибиотик физико-химических факторов внутренней среды макроорганизма. Поэтому не удивительно, что препараты, достаточно активные в опытах *in vitro*, иногда оказываются неэффективными в экспериментах на зараженных животных или при лечении больных людей. При этом лечение сапа и мелиоидоза осложнено природной устойчивостью возбудителей к химиотерапевтическим препаратам различных групп, включая аминогликозиды, пенициллины, цефалоспорины.

На основании изложенного вполне актуальным представляется изучение антибактериальной активности химиотерапевтических препаратов в отношении ряда буркхольдерий, имеющих медицинское значение, в условиях, моделирующих характер взаимодействия химиопрепаратов с микроорганизмами *in vivo*.

Цель исследования - изучение физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости патогенных буркхольдерий, влияющих на их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам.

Поставленная цель решена автором путем формулирования и решения пяти задач исследования- определения чувствительности буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам различными методами, выявления влияния некоторых физико-химических факторов на чувствительность патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам, изучения чувствительности возбудителей сапа и мелиоидоза в составе биопленок к ряду химиотерапевтических средств, сравнения действия химиопрепаратов на биопленочную и планктонную субпопуляции буркхольдерий и буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках и по итогам исследований подобрать антибактериальные препараты для адекватной терапии сапа и мелиоидоза. Поставленную автором цель исследования считаю актуальной. Сформулированные пять задач позволили автору обеспечить достижение цели исследования.

Диссертация изложена на 167 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 20 рисунками и 15 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 282 источников, из них 54 на русском и 228 на английском языках. Рецензент отмечает использование и современных литературных источников, включая и электронные формы публикаций.

В главе 1 автором проведен анализ данных литературы по трем направлениям — способам оценки чувствительности патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам и ее оценки *in vitro*, изучению факторов, влияющих на чувствительность микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам и основным принципам химиотерапии сапа и мелиоидоза. Безусловно, можно согласиться с выводом автора, что учитывая тяжесть клинического течения и природную резистентность возбудителей сапа и мелиоидоза к большинству химиотерапевтических

средств, ведущая роль в лечении этих заболеваний принадлежит раннему назначению адекватной химиотерапии наиболее эффективными антибактериальными препаратами. При этом существенными факторами, осложняющими терапию, являются снижение чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам при образовании биопленок и их внутриклеточная персистенция. Приведенные данные свидетельствуют о том, что для обеспечения успешной терапии сапа и мелиоидоза необходимо своевременное и достоверное определение чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам, разработка и соблюдение рациональных режимов и схем этиотропного лечения, сочетанное с внедрением принципиально новых подходов. Таким образом, на основании анализа литературы автор обосновал цель работы.

Глава 2 описывает методологию и методы исследования. В работе использованы широкий спектр экспериментальных методов исследования: микробиологических (культивирование микроорганизмов на питательных средах, оценка чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам), микроскопических (световая и электронная микроскопия микроорганизмов) и биологических (моделирование и лечение инфекций на лабораторных животных). Работа выполнена на большой коллекции штаммов. Использовали 20 штаммов *B. pseudomallei*, 14 штамма *B. mallei*, 14 штаммов *B. ceratiae*, предоставленных коллекционным центром ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Также были использованы 5 штаммов *B. thailandensis*, выделенные в Таиланде, предоставленные D. Woods, Калгари, 2002 г., и 1 штамм ресничных инфузорий *Tetrahymena pyriformis* GL, полученный из Института цитологии РАН, Санкт-Петербург. Особый интерес вызывают методики, направленные на изучение сравнительно нового научного направления- формирования биопленок и их роли в биологии возбудителей.

Глава 3 посвящена изучению оценки влияния ряда факторов на чувствительность различных видов буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам. Первоначально была изучена чувствительность четырех видов буркхольдерий (*B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. cepacia*, *B. thailandensis*) к химиотерапевтическим препаратам стандартными методами в жидкой и плотной питательной среде.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что наиболее устойчивы к химиотерапевтическим средствам штаммы сапрофитических видов. Принципиально эти данные не отличались от ранних наблюдений, за исключением, появления в списке проверенных ранее неизвестных химиопрепаратов. Проведенная сравнительная оценка антибиотикограмм полученных методами серийных разведений и диско-диффузионным, не выявляла существенных различий в результатах чувствительности у большинства изученных штаммов буркхольдерий. Поэтому вполне закономерен вывод автора о целесообразности использования наряду с методами серийных разведений и диско-диффузионного метода как менее трудоемкого и простого в выполнении и интерпретации.

Крайне полезным представляется использованный автором метод ускоренного определения и интерпретации результатов по антибиотикочувствительности буркхольдерий. Метод основан на применении плотной глюкозо-триптонной среды с индикатором бромтимоловым синим, у которого зона перехода окраски находится в диапазонах pH 6,0-7,6 (кислая - желтая, щелочная - синяя), исходный pH среды 6,8. Поскольку как и большинство видов бактерий буркхольдерии являются гликолитическими микроорганизмами, вызывающими при окислении глюкозы сдвиг pH среды в кислую сторону то этот процесс можно легко контролировать за счет изменения цвета индикатора. Предлагаемый ускоренный метод определения антибиотикочувствительности буркхольдерий позволяет через 4-6 ч от момента выделения культуры дать

достаточно информации для назначения экстренного лечения, однако он должен быть в дальнейшем подтвержден методом серийных разведений.

Далее автор приступил к изучению чувствительности культур буркхольдерий, пассированных на лабораторных животных и питательных средах, поскольку пассирование культур буркхольдерий через организм животных и пересевы на питательных средах в определенной мере моделируют динамику приспособляемости микроорганизмов в ходе инфекционного процесса и в условиях поддержания культур в лабораториях.

В результате проведенных экспериментов установлено, что многократные пересевы штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* на питательных средах незначительно влияют на уровень чувствительности культур к химиопрепаратам. Изменения чувствительности пассированных на питательных средах штаммов *B. thailandensis* к химиопрепаратам носили разнонаправленный характер. Было выявлено, что пассирование через организм животных приводящее к повышению вирулентности культур, как правило, вызывает достоверное снижение устойчивости патогенных буркхольдерий к изученным химиотерапевтическим препаратам, используемым в настоящее время в практике лечения сапа и мелиоидоза. Данное наблюдение согласуется с данными литературы, что одной из причин повышения вирулентности и снижения резистентности культур в процессе многократных пассажей через организм животных может быть ускоренное размножение штаммов с повышенной вирулентностью и ускоренным временем генерации.

В последующей серии экспериментов было изучено влияние физико-химических факторов среды на чувствительность буркхольдерий к химиопрепаратам в условиях, имитирующих процессы *in vivo*, а именно температуры, pH среды, добавление 5 % CO₂ и крови экспериментальных животных. Проведенные исследования свидетельствовали о том, что чувствительность буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам может

значительно изменяться в зависимости от температуры, наличия CO₂ и показателей pH окружающей среды. Полученные данные позволили заключить, что изучение антибиотикочувствительности буркхольдерий в стандартных условиях не может служить единственным определяющим фактором при отборе препаратов для лечения сапа и мелиоидоза. Для оценки эффективности химиотерапевтических препаратов в отношении патогенных буркхольдерий *in vitro* уместно воспроизвести условия, моделирующие характер взаимоотношений микроорганизма с антибиотиком *in vivo*, а именно добавить к среде Мюллер-Хинтона кровь экспериментальных животных и провести культивирование в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа.

Глава 4 посвящена изучению влияния адаптивной изменчивости на чувствительность различных видов буркхольдерий к химиотерапевтическим средствам. Из данных литературы известно, что буркхольдерии способны к образованию сложных сообществ - биопленок, приобретая при этом качественно новые свойства, т.н. биопленочный фенотип существенно отличающий их от бактерий, находящихся в планктонной форме. Поэтому первым этапом была изучена способность буркхольдерий к образованию биопленок на различных поверхностях.

В результате проведенных экспериментов установлено, что буркхольдерии легко образуют биопленки в жидких питательных средах на поверхности раздела фаз «жидкость-воздух». Для более детального изучения особенностей формирования биопленок бактериями рода *Burkholderia* была проведена световая и электронная микроскопия препаратов буркхольдерияльных биопленок.

Проведенное электронно-микроскопическое изучение буркхольдерияльных сообществ методом позитивного контрастирования ультратонких срезов выявило некоторые особенности их строения. Бактериальные клетки сообщества отличались между собой формой,

размером и электронной плотностью цитоплазмы. Некоторые из них имели типичную, сходную с планктонными клетками морфологию, другие были меньших размеров и с более плотной цитоплазмой. Кроме того, на поверхности клеточной стенки некоторых бактериальных клеток были выявлены многочисленные мембранные везикулы, умеренной электронной плотности, в которых, как известно, заключены продукты секреции бактериальных клеток. Характерным для грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и буркхольдрий, является накопление в клетках бактерий везикул с молекулами поли- β -оксибутирата где он может использоваться при неблагоприятных условиях как дополнительный источник питания.

Анализ литературных данных показал, что бактерии в составе биопленки обладают высокой резистентностью к химиотерапевтическим средствам. При этом биопленочная популяция бактерий способна выживать при воздействии химиопрепаратов в концентрациях, в десятки раз превышающих стандартные терапевтические дозы.

Исторически чувствительность к химиопрепаратам определяют на модели планктонной популяции бактерий, и, поскольку планктонные клетки защищены хуже, чем биопленки, то препараты, высоко активные *in vitro* при тестировании в чистой культуре, при испытаниях *in vivo* могут показать снижение эффективности, что обусловлено наличием биопленок. В связи с этим, автором была изучена чувствительность буркхольдрий в составе биопленок к химиотерапевтическим препаратам, применяемым в стандартных схемах лечения (доксидиклину, ко-тримоксазолу, цефтазидиму, рифампицину, меропенему). В результате проведенных экспериментов установлено, что биопленочная популяция буркхольдрий повышает резистентность к изученным химиопрепаратам более чем в 10 раз, по сравнению с планктонными культурами тех же штаммов, о чем свидетельствовало достоверное увеличение МПК. Особо следует отметить,

что ни один из изученных препаратов не является эффективным в отношении зрелых предварительно сформированных мелиоидозных биопленок. Возбудитель мелиоидоза в составе биопленки более устойчив к химиопрепаратам, чем возбудитель сапа, хотя формирование биопленок также приводит к значительному повышению резистентности сапных штаммов к химиопрепаратам по сравнению с чувствительностью планктонных культур.

Поэтому логичным видится следующий этап работы – оценка влияния химиотерапевтических средств на процесс формирования буркхольдериями биопленок. Для этого в среду культивирования перед формированием буркхольдериями биопленок одновременно с бактериальным инокулятом вносили препараты в концентрациях, которых они достигают в тканях макроорганизма при лечении сапа и мелиоидоза: меропенем - 30 мкг/мл, цефтазидим - 30 мкг/мл, доксициклин - 4 мкг/мл, ко-тримоксазол - 100 мкг/мл, амоксиклав - 25 мкг/мл, азитромицин - 25 мкг/мл, рифампицин -15 мкг/мл.

Проведенные исследования показали, что изученные антибактериальные препараты в концентрациях, которых они достигают в тканях макроорганизма при лечении терапевтическими дозами, препятствуют образованию биопленок сапными культурами. Против биопленок остальных видов буркхольдерий высоко активными были меропенем, цефтазидим и ко-тримоксазол.

Полученные автором данные лишний раз свидетельствуют о необходимости соблюдения рациональных методов и схем химиотерапии инфекций, вызванных буркхольдериями, так как своевременное начало лечения снижает вероятность формирования возбудителем биопленки и перехода болезни в хроническую форму, трудно поддающуюся лечению.

Следующим этапом исследования был анализ чувствительности к химиотерапевтическим средствам патогенных буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках.

Возбудители сапа и мелиоидоза способны выживать внутри клеток макроорганизма, длительное время персистировать, размножаться и вновь распространяться после завершения курса химиотерапии, приводя к развитию хронических форм и рецидивов заболевания. Однако далеко не все из химиопрепаратов обладают хорошей способностью проникать в клетки организма, создавать в них достаточную концентрацию и сохранять свою биологическую активность. Поэтому автором была изучена чувствительность буркхольдерий, интернированных в эукариотические клетки, к ряду химиотерапевтических средств, рекомендуемых для лечения сапа и мелиоидоза (меропенем, цефтазидим, доксициклин, ко-тримоксазол). В качестве моделей для оценки чувствительности к химиопрепаратам внутриклеточно персистирующих буркхольдерий были выбраны перитонеальные мышинные макрофаги и простейшие вида *T. pyriformis*, которые в настоящее время широко применяются при изучении биологических свойств бактерий (адгезивности, инвазивности, устойчивости к фагоцитозу и патогенности).

Проведенные исследования показали, что *B. mallei* и *B. pseudomallei*, интернированные в макрофаги, более резистентны к изученным химиопрепаратам по сравнению с их планктонными культурами, о чем свидетельствует значительное увеличение МБК для интернированных буркхольдерий. Оценка резистентности буркхольдерий на модели «макрофаг - буркхольдерия» показала, что наиболее эффективным из препаратов является меропенем, активность которого особенно выражена в отношении возбудителя сапа.

В опытах с простейшими на модели «тетрахимена - буркхольдерия» установлено, что в сокультурах рост микроорганизмов подавляется

концентрациями химиотерапевтических препаратов, в десятки раз превышающими исходные МПК для планктонных взвесей.

Таким образом, из полученных данных автор совершенно закономерно заключил, что патогенные буркхольдерии, интернированные в эукариотические клетки (макрофаги или простейшие), обладают повышенной резистентностью к антибактериальным препаратам, что во многом объясняет не только устойчивость некоторых из них во внешней среде, но и недостаточную эффективность лечения заболеваний, вызываемых ими у человека и животных. Только меропенем обладает достаточно высокой активностью в отношении всех изученных штаммов сапа и мелиоидоза, интернированных в простейшие и макрофаги.

В свете полученных ранее данных закономерно проведение исследований, описанных в Главе 5, по анализу терапевтической эффективности химиопрепаратов при лечении экспериментального сапа и мелиоидоза.

Для проведения химиотерапии экспериментального сапа и мелиоидоза были выбраны штаммы буркхольдерий *B. mallei* 10230, *B. pseudomallei* C-141. Кроме того, автор основывался на полученных в настоящей работе результатах определения чувствительности патогенных буркхольдерий с учетом факторов, влияющих на взаимодействие антибиотика с микроорганизмом *in vivo*, а именно, культивировании в среде с добавлением крови лабораторных животных в атмосфере содержащей 5 % CO₂, а также при различных диапазонах pH и температуры.

В результате проведенных исследований установлено, что из отобранных препаратов для терапии высокочувствительных к мелиоидозной и сапной инфекции золотистых хомячков наиболее эффективным оказался ко-тримоксазол в суточной дозе 100 мг/кг. При этом резистентность буркхольдерий к изученным химиотерапевтическим препаратам достоверно повышается при определении чувствительности к ним в модифицированных

условиях, близких к среде макроорганизма (культивировании в питательной среде с добавлением крови лабораторных животных и в атмосфере содержащей 5 % CO₂). Поэтому закономерен вывод автора, что недостаточная эффективность препаратов может быть связана с влиянием физико-химических факторов внутренней среды макроорганизма.

Антибактериальная терапия острых форм сапа у экспериментальных животных в большинстве случаев приводит лишь к увеличению продолжительности жизни павших животных, а среди выживших после лечения наблюдается высокая частота рецидивов заболевания. Однако полученные в настоящем исследовании данные на модели буркхольдерий, интернированных в клетки простейших и перитонеальные мышинные макрофаги, ставят под сомнение эффективность лечения острых форм сапа указанными препаратами, кроме меропенема, так как МБК меропенема для внутриклеточных бактерий *B. mallei* ниже или сопоставимы с МДК. Это предполагает высокую вероятность рецидивов заболевания после окончания терапии, так как именно в этот период, несмотря на отсутствие жизнеспособных бактерий в плазме крови, становится возможным выход возбудителя сапа из эукариотических клеток и появления симптомов реинфекции.

Для повышения эффективности экстренной профилактики и терапии острых форм сапа с использованием меропенема было проведено лечение инфицированных *B. mallei* золотистых хомячков химиопрепаратами в клатратной и липосомальной формах. Известно, что включение препарата в состав липосом увеличивает его биодоступность за счет направленного транспорта химиотерапевтических средств внутрь клеток (например, макрофагов), где локализуются возбудители инфекции.

Эффективность химиотерапии экспериментального сапа значительно повышалась при введении антибактериальных препаратов в клатратной форме (комплексное соединение с высокомолекулярным декстраном) и

особенно в липосомальной форме. Наибольшая эффективность при экстренной профилактике и лечении острых форм сапа у золотистых хомячков была достигнута при использовании липосомальной формы меропенема (60-100 % выживших животных). Следует отметить, что длительность введения препарата должна быть не менее двух недель, так как терапия менее десяти дней даже при использовании липосомальных форм химиопрепаратов в режиме экстренной профилактики не обеспечивает 100 % защиту.

В проведенных исследованиях увеличение сроков введения липосомального меропенема до 15 дней обеспечивало 100 % выживаемость животных и санацию организма от патогена даже при начале терапии через двое суток после инфицирования. Следует отметить высокую saniрующую активность липосомального меропенема, поскольку выделить культуру возбудителя сапа от умерщвленных на 22 сутки после заражения животных не удалось. Из этого следует, что липосомальная форма меропенема является высокоэффективным средством лечения, обеспечивающим 60-100 % выживаемость и санацию организма от сапного микроба даже при начале лечения через 48 ч после заражения.

В Заключении автор подвел итог проведенной работы и сформулировал дальнейшие пути изучения проблемы по подбору наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов и разработке схем лечения людей при сапе и мелиоидозе.

Приведенные фактические экспериментальные результаты позволяют сделать вывод о доказанности пяти основных положений диссертации, вынесенных на защиту. Диссертант сформулировал шесть выводов, которые обосновывают защищаемые позиции. Выводы четко сформулированы. Работа написана хорошим литературным языком, практически без ошибок, легко читается. Иллюстративный материал (таблицы и рисунки) доказывает полученные результаты.

Оценка новизны и достоверности. На взгляд рецензента новизну полученных данных однозначно доказывают два патента № 2404252 от 27.04.2009 г. «Способ подбора высокоактивного антибактериального средства для лечения заболеваний, вызываемых патогенными буркхольдериями» и № 2490013 от 06.07.2012 г. «Способ лечения экспериментального сапа».

Проведено комплексное исследование чувствительности *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia thailandensis* к химиопрепаратам в стандартных условиях и условиях, моделирующих характер взаимодействия микроорганизма с макроорганизмом *in vitro*. Установлены значительные различия в антибиотикочувствительности буркхольдерий, зависящие от влияния физико-химических факторов среды (рН, температуры, наличия 5 % двуокиси углерода в атмосфере и белков плазмы крови в питательной среде). Проведена сравнительная оценка антибиотикочувствительности планктонных и биопленочных культур буркхольдерий. Установлено, что *B. mallei* и *B. pseudomallei* в составе зрелых биопленок высокорезистентны к химиотерапевтическим препаратам, применяемым при лечении сапа и мелиоидоза. Выявлена ингибирующая активность антибактериальных препаратов на ранних стадиях образования культурами биопленок. Впервые в качестве моделей для изучения чувствительности к химиотерапевтическим средствам буркхольдерий, персистирующих в эукариотических клетках, использовали перитонеальные мышинные макрофаги и свободноживущие простейшие вида *Tetrahymena pyriformis*. Было выявлено, что патогенные буркхольдерии, интернированные в эукариотические клетки (макрофаги или простейшие), обладают повышенной резистентностью к химиотерапевтическим средствам, входящим в стандартные схемы лечения сапа и мелиоидоза. Впервые показана высокая эффективность экстренной профилактики и лечения острого экспериментального сапа липосомальными формами меропенема.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Диссертационная работа выполнена в лаборатории диагностики и химиотерапии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках трех плановых НИР: 048-2-08, 058-3-11 и 070-6.11-11. Результаты исследования получены с использованием современного сертифицированного и прошедшего метрологическую проверку оборудования, с последующей статистической обработкой и научным анализом полученных данных.

Материалы диссертации были представлены на девяти конференциях (Иркутск, 2009); (Ставрополь, 2010); (Москва, 2011); (Москва, 2012); (Волгоград, 2012); (Новосибирск, 2013); (Санкт-Петербург, 2014); (Иркутск, 2014) и (Ростов-на-Дону, 2014).

Практическая значимость работы. Материалы настоящего исследования использованы при написании главы «Мелиоидоз» в методических указаниях Федерального уровня 4.2.2787-10. 4.2. «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика мелиоидоза», утвержденных Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г. Онищенко 06.12.2010 г. Два патента зарегистрированы в Государственном реестре изобретений Российской Федерации. Подготовлены и оформлены «Методические рекомендации по созданию селективных сред для возбудителей сапа и мелиоидоза», утвержденные директором ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора В.В. Алексеевым 29.12.2010 г., протокол №10.

Материалы диссертационной работы используются при проведении курса лекций и практических занятий отделом подготовки специалистов по

особо опасным инфекциям ФКУЗ Волгоградский научно- исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Личный вклад соискателя Автором проведен анализ литературы по изучаемой проблеме. Экспериментальные данные, на основе которых сформулированы выносимые на защиту положения и выводы, получены соискателем самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования, подготовке и проведении экспериментальных работ, обработке и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций. Отдельные эксперименты были выполнены совместно с сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. В четырех опубликованных работах Елена Владимировна является первым автором.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе, 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Получены два патента на изобретения.

Автореферат написан грамотно, отражает основные положения выносимые на защиту и обосновывает сделанные автором выводы. Иллюстрации наглядны и информативны.

Замечания. Принципиальных замечаний нет.

Имеется ряд не вполне удачных формулировок. Например, стр 10 «Впервые в рамках одной работы продемонстрирована принципиальная способность различных видов буркхольдерий к образованию биопленок на абиотических поверхностях в условиях *in vitro*». Рецензенту кажется, что более удачным будет заявить, что по одной методике на способность к формированию биопленок изучен большой набор штаммов буркхольдерий.

Стр 8 «обеспечение успешной терапии сапа и мелиоидоза требует учета особенностей патогенеза, поскольку подбор химиопрепаратов в стандартных

условиях рассчитан, в основном, на планктонные клетки, изолированные друг от друга». Рецензенту кажется, что тут более удачным будет формулировка – исторически подбор химиопрепаратов проводился на планктонных формах. Высказанные замечания не снижают положительного впечатления от рассматриваемой работы.

В качестве пожелания на защите хотелось бы услышать как сделанные автором выводы по подбору соответствующих химиопрепаратов будут реализованы для внедрения на практике.

Интересно услышать в свете полученных результатов предложения автора по подбору дезинфектантов. Возникает закономерный вопрос – используемые способы дезинфекции рассчитаны на планктонные формы или на биопленочный фенотип. Рецензент понимает, что данные пожелания выходят за пределы данной работы, но они имеют большое значение для практики и мнение автора очень важно.

На основании изучения работы рецензент делает вывод, что по своей актуальности и новизне, объему проведенных исследований, методическому уровню решения ее задач, научно-практической значимости полученных результатов представленная ШУБНИКОВОЙ ЕЛЕНОЙ ВЛАДИМИРОВНОЙ диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И ФОРМ АДАПТИВНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ» 03.02.03 – микробиология полностью соответствует требованиям п. 9 положения ВАК «О порядке присуждения ученых степеней и званий...» (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор ШУБНИКОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА заслуживает присуждения

ученой степени кандидата медицинских наук по специальности
03.02.03 – микробиология.

Заведующий лабораторией ФКУЗ «Ростовский научно-
исследовательский противочумный институт»

д.м.н.

Водопьянов С.О.

Подпись заведующего лабораторией биохимии Водопьянова С.О.

«ЗАВЕРЯЮ»

Начальник отдела кадров ФКУЗ «Ростовский научно-исследовательский
противочумный институт»

Бурик Е.Н.

31.05.2015.