

ОТЗЫВ
на автореферат диссертации Шубниковой Елены Владимировны
"Влияние физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости на
чувствительность патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим
препаратам", представленной на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук по специальности
03.02.03 - микробиология

При заболевании человека острыми формами сапа и мелиоидоза решающее значение имеет раннее начало лечения эффективными химиотерапевтическими препаратами. Для определения чувствительности культур патогенных буркхольдерий нашли применения методы *in vitro*: метод серийных разведений на плотной или жидкой питательной среде и диско-диффузионный способ. Однако устойчивость патогенов в условиях *in vivo* не всегда совпадает с данными полученными *in vitro*. Это может быть связано с воздействием ряда факторов макроорганизма (рН, температура, доступность кислорода), со способностью микроорганизмов образовывать биопленки, а также персистировать в клетках фагоцитарного ряда (лейкоциты, макрофаги), нефагоцитарных клетках и клетках простейших. В связи с этим, диссертационная работа Шубниковой Е.В., направленная на изучение физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости патогенных буркхольдерий, влияющих на их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам, несомненно, актуальна.

Для достижения поставленной цели Елена Владимировна решает задачи по следующим направлениям:

- определить чувствительность буркхольдерий к антибактериальным препаратам различными методами,
- выявить влияние рН среды, температуры, давления 10 % крови и культивирование в атмосфере, содержащей 5 % двуокиси углерода, на чувствительность патогенных буркхольдерий к антибактериальным препаратам,
- изучить чувствительность возбудителей сапа и мелиоидоза в составе биопленок и персистирующих в эукариотических клетках к ряду химиотерапевтических средств,
- подобрать антибактериальные препараты для адекватной терапии сапа и мелиоидоза.

На первом этапе своей работы автором была определена чувствительность к антибактериальным препаратам четырех видов буркхольдерий: *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. seracria* с помощью методов серийных разведений и диско-диффузионным, в том числе с использованием Е-теста. Установлена сопоставимость данных, полученных разными методами, однако наибольшей точностью характеризуется первый подход, тогда как второй - быстротой выполнения и низкой трудоемкостью. Среди изученных видов буркхольдерий высокой устойчивостью обладают сапрофитные виды *B. thailandensis*, *B. seracria*, а самой низкой - *B. mallei*.

В ходе ряда экспериментов подтверждена эффективность разработанного ранее способа ускоренного определения резистентности патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам за счет введения в состав глюкозо-триптонной среды индикатора бромтимолового синего. Такой подход позволил получить ответ через 4-6 ч по сравнению с традиционной методикой - через 24-48 ч.

Длительное пассирование культур *B. mallei* и *B. pseudomallei* на плотной питательной среде не влияло на их чувствительность к антибактериальным препаратам,

тогда как пассирование через организм биопробных животных приводило к снижению их устойчивости к этим средствам. С другой стороны повышений устойчивости штаммов данных видов к химиотерапевтическим препаратам отмечено под воздействием pH среды, температуры, добавления крови лабораторных животных и при культивировании в атмосфере с 5 % двуокиси углерода. При этом для ряда антибактериальных препаратов, например, ко-тримоксазол, наблюдался обратный эффект - снижение устойчивости.

На следующем этапе исследований Еленой Владимировной была изучена способность буркхольдерий к образованию биопленок на различных поверхностях *in vitro* и как переход в такое состояние влияет на чувствительность патогенов к химиотерапевтическим средствам. Показано, что резистентность биопленочных культур выше более чем в 10 раз, по сравнению с единичными клетками возбудителей, при этом штаммы *B. pseudomallei* характеризовались наибольшей устойчивостью. В тоже время антибактериальные препараты способны нарушать формирование биопленок у данных видов. Особый интерес представляют данные, полученные автором при изучении воздействия антибактериальных средств на возбудителей сапа и мелиоидоза, персистирующих в эукариотических клетках. Во всех случаях наблюдалось повышение устойчивости изученных культур данных патогенов к выбранным химиотерапевтическим препаратам.

При лечении экспериментального сапа и мелиоидоза наиболее эффективным оказался ко-тримоксазол: наблюдалось снижение уровня летальности при заражении *B. mallei* и увеличение продолжительности жизни животных при обеих инфекциях, а также ципрофлоксацин и доксициклин: увеличивается продолжительность жизни животных, но при мелиоидозной инфекции не предотвращается её летальность. При использовании для лечения клатратных и липосомальных форм антибактериальных препаратов отмечено повышение их эффективности. Введение доксициклина в клатратной форме обеспечивало 80 % выживаемость животных, тогда как в виде эмульсии - только 50 %. Липосомальные формы меропенема оказались наиболее эффективными при экстренной профилактике и лечении острых форм сапа и мелиоидоза у золотистых хомячков: до 60-100 % выживаемость животных и в ряде случаев полная санация организма от сапного микробы.

На основании полученных данных автор делает обоснованный вывод о том, что прогнозирование результатов лечения сапа и мелиоидоза различными химиотерапевтическими средствами становится более точным при использовании методов, позволяющих оценить взаимодействие клеток патогена и антибиотика в условиях максимально приближенных к макроорганизму. Применение моделей "макрофаг-буркхольдерия" и "тетрахимена- буркхольдерия" позволяет определить в условиях *in vivo* активность и отобрать антибактериальными препаратами, перспективные для лечения экспериментальных инфекций на животных.

Выводы сделанные автором обоснованы, не вызывают сомнения и соответствуют цели и поставленным задачам. Положения, выносимые на защиту, отражают результаты проведенных исследований. Основное содержание диссертации отражено в 14 опубликованных работ, шесть из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Материалы работы нашли применение при подготовке методических указаниях 4.2.2787-10 "Лабораторная диагностика мелиоидоза", двух патентов на изобретение (№ 2404252 от 27.04.2009 г., № 2490013 от 06.07.2012 г.), методических рекомендаций по созданию селективных сред для возбудителей сапа и мелиоидоза, утвержденных директором ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ Роспотребнадзора.

Таким образом, диссертационная работа Шубниковой Е.В. "Влияние физико-химических факторов и форм адаптивной изменчивости на чувствительность патогенных буркхольдерий к химиотерапевтическим препаратам" посвящена актуальной проблеме, выполнена на большом материале с использованием современных технологий, полученные результаты имеют новизну, теоретическую и практическую значимость, могут быть использованы для повышения эффективности терапии и профилактики сапа и мелиоидоза. Диссертационная работа соответствует критериям "Положения о порядке присуждения ученых степеней" пп. 9, 10, 11 и 13, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации N 842 от 24 сентября 2013 гг., а её автор Шубникова Елена Владимировна заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Заведующая лабораторией
молекулярной диагностики
Федерального казенного учреждения
здравоохранения Российский
научно-исследовательский
противочумный институт "Микроб"
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека
кандидат биологических наук

Н.А. Осина

410005, г. Саратов,
ул. Университетская, 46
Тел. 8(8452) 51-52-12, 89198278822
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Подпись Н.А. Осиной ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров
ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб"
Роспотребнадзора



К.В. Бычков