

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Пименова Николая Васильевича на диссертацию Пашковой Татьяны Михайловны «Роль факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов в инфекционном процессе», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

### **1. Актуальность темы диссертационной работы.**

Факторные инфекции животных из-за их широкой распространённости и нозологической вариабельности являются актуальной проблемой ветеринарной медицины. Этиологические агенты, вызывающие данные инфекционно-воспалительные заболевания, принадлежат к комменсальной симбионтной микрофлоре макроорганизма, устойчивое сосуществование которой с хозяином возможно при наличии у микроорганизмов определённых биологических свойств – персистентных характеристик, направленных на деградацию механизмов резистентности макроорганизма.

Изучение роли условно-патогенных микроорганизмов, их факторов персистенции является актуальной задачей не только ветеринарных микробиологов. Распространение агрессивных штаммов условно-патогенных микробов свидетельствует об изменении отношений макро- и микроорганизмов. Обогащение знаний о роли персистенции таких микроорганизмов позволит оптимизировать терапевтические и профилактические подходы в борьбе с заболеваниями, вызванными или осложненными условно-патогенными микробными агентами. В этой связи разработка методов прогнозирования фенотипического проявления факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов имеет практическую значимость.

Несмотря на признание связи персистентного потенциала возбудителей с возникновением и особенностями течения инфекционно-воспалительного процесса вопрос о патогенетической роли персистентных характеристик бактерий и грибов в развитии факторных инфекций животных остаётся открытым. Отсутствует комплексная оценка персистентного потенциала возбудителей эндогенных инфекций животных; недостаточно исследованы биопрофили приоритетных возбудителей и не выявлены информативные биомаркеры для разработки на их основе новых технологий прогнозирования развития факторных инфекционно-воспалительных заболеваний, а имеющиеся данные о модификации персистентных свойств возбудителей факторных инфекций в микробных ассоциациях крайне малочисленны.

Отсутствие ответов на поставленные вопросы не способствует решению

фундаментальной проблемы осуществления контроля за интенсивностью распространения факторных инфекционных болезней, которые наносят основной ущерб животноводству России.

В силу сказанного, выполненная Т.М. Пашковой диссертационная работа по определению биологической и патогенетической значимости персистентных свойств микроорганизмов при факторных инфекциях животных и разработке подходов к дифференциации штаммов, прогнозированию течения и терапии эндогенных инфекций является весьма своевременной и актуальной.

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

Основные научные положения, выводы и рекомендации по использованию научных выводов сформулированы, исходя из результатов комплексной оценки биологических свойств 893 культур микроорганизмов, изолированных от здоровых животных и животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями в период с 2010 по 2017 гг. Большой пул экспериментальных данных характеризует фенотипы возбудителей факторных инфекций и представителей мутуалистической микробиоты. В частности, исследована способность микроорганизмов деградировать лизоцим, карнозин, лактоферрин, цитокины, IgA, гемоглобин, образовывать биоплёнки. Изучена чувствительность бактерий и грибов к антимикробным препаратам методом диффузии в агар.

Татьяна Михайловна Пашкова провела большую, многоплановую и последовательную работу для достижения цели исследований – установить биологическую и патогенетическую значимость персистентных свойств микроорганизмов при факторных инфекциях животных, а также разработать подходы к дифференциации штаммов, прогнозированию течения и терапии эндогенных инфекций. При использовании полимеразной цепной реакции определены основные генетические детерминанты вирулентности и бактериоциногении симбиотических энтерококков. Проведено полногеномное секвенирование культуры *Enterococcus* spp., сборка генома de novo с помощью программного обеспечения SPAdes. Аннотирование полученных в результате полногеномного секвенирования контигов осуществлено с использованием алгоритма NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline.

Проведена экспериментальная оценка межмикробных взаимодействий доминантных и ассоциативных микроорганизмов при их совместном культивировании. Методом соинкубирования определено регулирующее влияние биологически активных веществ (антимикробные пептиды, фитосубстанции) на персистентный потенциал микроорганизмов.

Таким образом, достаточный объём проведённых исследований при ис-

пользовании адекватных и современных методов позволили, по сути, рассмотреть основные аспекты поставленной в работе проблемы благодаря решению задач, стоявших перед автором, и обосновать все положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации.

### **3. Достоверность результатов и новизна исследований и полученных результатов.**

При выполнении исследования соискатель использовала микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические методы исследований, что, несомненно, характеризует ее как знающего, высококвалифицированного научного сотрудника. Автор диссертации проведены широкие исследования на достаточном фактическом материале. Применены методы статистической обработки и биологического анализа, достоверность полученных данных сомнений не вызывает. В результате кропотливой работы получены штаммы *Enterococcus faecium* – продуценты бактериоцинов, снижающие способность образования биопленок гриба рода *Candida*. Установлено, что под действием природных и синтетических антимикробных пептидов подавляется способность микроорганизмов к инактивации факторов естественной резистентности.

Диссертант методически грамотно и в правильной последовательности осуществляла исследования, получив данные по фенотипическому проявлению факторов персистенции микроорганизмов, разработав регрессионные математические модели с прогнозированием исхода заболевания, получив индикаторные штаммы для определения антибиотикочувствительности, способные более эффективно осуществлять эмпирическое лечение в экстренных случаях с применением антибактериальных средств.

Научные исследования подкреплены патентами, внедрением программ для ЭВМ, полногеномным секвенированием с биоинформационным анализом штамма *Enterococcus faecium* ICIS 96, обладающего высокими антагонистическими свойствами.

Достоверность полученных результатов и выводов обоснована правильными теоретическими положениями, основанными на знании современной литературы, адекватным выбором методов исследования, большим объёмом проведённых экспериментов, достаточным для решения каждой из поставленных задач и корректной статистической обработкой полученных данных.

Новизна исследований, представленных в диссертационной работе Т.М. Пашковой, очевидна, так как в работе расшифрована патогенетическая роль персистентных характеристик бактерий и грибов в развитии факторных инфекционно-воспалительных заболеваний у животных, которая не была раскрыта ранее в отечественной и зарубежной литературе. Автор показала, что факторы

персистенции широко распространены среди циркулирующих штаммов, выделенных при различных нозологиях, при этом выраженность исследуемых признаков выше при хроническом течении заболевания по сравнению с острым. Проведённая Т.М. Пашковой работа открывает практическим ветеринарным специалистам новый дополнительный способ прогнозирования течения инфекционно-воспалительных заболеваний у животных (свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2017616114, № 2018616909).

Автором подробно изучены персистентные свойства микросимбионтов в условиях межмикробных взаимодействий. Выявлено повышение экспрессии персистентных свойств ассоциативной микрофлоры при межмикробных взаимодействиях *in vitro*, что следует рассматривать как один из механизмов, способствующих формированию патобиоценоза, на фоне которого развиваются эндогенные инфекции животных. Установлено подавление факторов персистенции грибов рода *Candida* под действием доминантной микрофлоры (*Enterococcus* spp.) и отобран штамм *Enterococcus faecium*, обладающий способностью снижать образование биоплёнок грибами (патент РФ № 2576008).

Научная новизна работы Т.М. Пашковой также включает разработку подходов к дифференциации микроорганизмов на патогенные штаммы и представителей мутуалистической микробиоты (патент РФ № 2612141; свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2018617605), основанных на оценке персистентного потенциала бактерий.

Интересными и важными для практической ветеринарной медицины являются полученные данные о способности биологически активных веществ различного генеза снижать персистентные характеристики микроорганизмов.

Разработанный диссертантом алгоритм выбора лекарственных растений для терапии животных с эндогенными инфекциями (свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2018617097) заслуживает отдельного внимания, так как в арсенале ветеринарной медицины не так много способов борьбы с микроорганизмами, способными длительно персистировать в организме хозяина, хотя этот метод не может являться универсальным в достаточной степени.

#### **4. Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.**

Проведенная Татьяной Михайловной Пашковой работа – серьезный труд, обогащающий знания о факторных инфекциях. Результаты диссертационной работы могут быть использованы для прогнозирования течения эндогенных инфекционных заболеваний, в эмпирической экстренной антибактериальной терапии болезней, вызванных эндогенными инфекционными агентами.

Теоретическая значимость работы отражается большим объемом

накопленных материалов по экспрессии факторов персистенции и их систематизацией, открывающей возможность для дифференциации потенциально патогенных штаммов представителей эндогенной микрофлоры.

Значимость выполненной Т.М. Пашковой работы для ветеринарной микробиологии состоит в доказанной роли факторов персистенции микроорганизмов в развитии инфекционной патологии. Особый интерес и теоретическую ценность представляют данные о механизмах формирования патобиоценозов, на фоне которых возникают факторные заболевания.

Практическая ценность работы состоит в том, что определены биопротипы приоритетных возбудителей факторных инфекций животных, позволившие выявить информативные биомаркеры и разработать на их основе новые технологии прогнозирования развития инфекционно-воспалительных заболеваний.

Разработанные автором методологические подходы к дифференциации штаммов, прогнозированию течения и терапии эндогенных инфекций послужили основой для разработки четырёх программ для ЭВМ. Разработанная схема очистки антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней (патент РФ № 2645070), обладающих антиперсистентным действием, может служить основой для разработок в направлении совершенствования подходов в борьбе с персистирующими патогенами.

Запатентованный штамм *Staphylococcus aureus*, обладающий высокой антилизосимной активностью (патент РФ № 2568058), можно использовать для скрининга антибактериальных средств, пригодных для борьбы с персистирующими патогенными стафилококками. В международную базу данных GenBank депонирован полный геном бактериоцинопродуцирующей культуры *Enterococcus faecium* ICIS 96, что, несомненно, расширяет знания о биологических свойствах энтерококков и может служить основой разработок в направлении создания новых противоинфекционных биопрепаратов.

Информация об антибиотикорезистентности возбудителей эндогенных инфекций может быть использована для оптимизации подбора препарата при эмпирической терапии животных с факторными заболеваниями.

## **5. Содержание диссертации, её завершенность.**

Диссертация Т.М. Пашковой построена по традиционному плану и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Собственные исследования», включающие описание материалов и методов и результатов исследований в трех подразделах, «Заключение», «Выводы», «Рекомендации по использованию научных выводов», «Список сокращений» и «Библиографический список». Работа изложена на 276 страницах машинописного текста, иллюстрирована 37 рисунками и 24 таблицами.

В главе «Введение» автором обосновывается актуальность диссертационного исследования и аргументируется соответствие диссертации паспорту заявленной научной специальности; сформулированы цель и задачи работы; научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, охарактеризована методология и методы исследования, апробация результатов и личное участие автора; изложены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из трёх глав, в которых проведён детальный анализ данных отечественной и зарубежной литературы. В литературном обзоре раскрыты современные представления об этиологии и патогенезе факторных инфекций животных, дана характеристика персистентного потенциала микроорганизмов разных таксономических групп. Отдельно рассмотрены прикладные аспекты использования факторов персистенции микроорганизмов. Чётко обозначены нерешенные проблемы, которым посвящено диссертационное исследование. Следует отметить, что 163 цитируемых автором источника литературы, составляют 40% от общего числа и опубликованы за последние 5 лет. Это свидетельствует о том, что автор диссертации действительно хорошо осведомлена о современном состоянии исследований в той области знаний, в которой она проводила свои изыскания. Все упомянутые в тексте работы присутствуют в библиографическом списке.

Подраздел «Материалы и методы исследования» даёт представление о сроках и месте проведения диссертационной работы. Приводится характеристика групп обследуемых животных и выделенных культур, описаны основные методические приёмы, использованные автором в ходе выполнения работы, включая методы статистической обработки данных. Глава написана подробно и не вызывает возражений.

Результаты исследований суммированы в соответствующей главе, которая разбита на три подглавы, каждая из которых начинается развёрнутым обоснованием следующей ниже работы.

На начальном этапе автором был изучен видовой состав микроорганизмов, выделенных от животных с факторными заболеваниями. Полученные результаты позволили подтвердить доминирующее положение в биоценозе наружного слухового прохода у собак с разным течением отита грибов рода *Malassezia* и бактерий, относящиеся к роду *Staphylococcus*. В ходе исследования видового состава микроорганизмов была установлена ведущая роль энтеробактерий в развитии таких гнойно-воспалительных заболеваниях собак, как пиометра и конъюнктивит, что отличается от преобладающих данных. При изучении этиологии маститов у коров автором было показано, что доминирующим видом как при клинической, так и при субклинической форме заболевания является *S. aureus*, который наиболее часто выделяли в монокультуре. Результаты исследований по оценке видовой многообразия энтерококков, выделенных от

животных, свидетельствуют о доминировании штаммов *E. faecalis* среди клинических изолятов *Enterococcus* spp. В то время как в популяции энтерококков кишечной микрофлоры животных, по данным автора, преобладают культуры non-*faecalis* видов. Т.М.Пашковой были охарактеризованы биологические свойства микроорганизмов, выделенных от животных с факторными заболеваниями. Основным результатом данного этапа работы стала сравнительная оценка широкого спектра факторов персистенции и антибиотикорезистентности возбудителей факторных инфекций животных. Отдельного внимания заслуживает создание простых и эффективных методов прогнозирования развития хронического наружного отита у собак, субклинического мастита у коров стафилококковой и стрептококковой этиологии и алгоритма для дифференциальной диагностики клинически значимых штаммов энтерококков и представителей нормальной микрофлоры животных.

На заключительном этапе работы в ходе изучения регуляции персистентного потенциала микроорганизмов факторами различного генеза была показана возможность использования эндогенных антибиотиков животного происхождения, их синтетических производных и фитосубстанций в качестве средств, эффективно ингибирующих факторы персистенции возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний животных.

Результаты опытов по оценке выраженности биоплёнкообразования и антилизоцимной активности в условиях межмикробных взаимодействий позволили раскрыть один из механизмов, способствующих формированию патологического микробиоценоза, на фоне которого возникает заболевание и происходит его хронизация.

Следует отметить, что представлен большой объём исследований, но результаты изложены достаточно лаконично.

В главе, посвящённой обсуждению результатов, автор суммирует полученные данные и интерпретирует их с учетом известных фактов, подробно изложенных в литературном обзоре. Это не только показывает, что диссертант ориентируется в проблеме, но и позволяет оценить новизну исследований.

Выводы непосредственно вытекают из собственных исследований автора и отражают решение задач, однако, носят преимущественно констатационно-отчетный характер, а не информационно-научный.

Библиографический список включает 411 литературных источников, из которых 175 иностранных.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она написана на высоком методическом уровне и хорошо оформлена. Представленные в работе рисунки и таблицы наглядно иллюстрируют полученные автором результаты. Каждый раздел завершается кратким резюме, что удобно для понимания содержания этой ёмкой работы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Материалы диссертации отражены в 43 печатных работах, опубликованных в международных и российских изданиях, в том числе – 16 статей в журналах, включённых в список рекомендованных ВАК РФ, 7 из которых входят в международные базы цитирования Web of Science, Scopus, Pub Med, а также в информационно-методическом письме, четырёх патентах РФ на изобретения и четырёх свидетельствах о государственной регистрации программ для ЭВМ.

Содержание диссертационной работы Т.М. Пашковой соответствует специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Положительно оценивая работу в целом, подчеркивая ее новизну и значимость для науки и практики, хотелось бы получить ответ диссертанта на следующие вопросы и замечания:

1. В тексте диссертации автор не использовала общепринятые ссылки на источники согласно ГОСТ Р 7.0.11.-2011, что не позволяет в полной мере ознакомиться с данными, носящими дискуссионный характер. Так, в обзоре указано, что представители симбиотической бактериальной микрофлоры семейства *Vifidobacterium* обладают антилизоцимной активностью, такие свойства микроорганизма являются одним из 4 факторов персистенции. Данный признак относят к дистантной нейтрализации воздействующего фактора. Как автор обосновывает, что 4 фактора персистенции и их экспрессивность свидетельствуют о патогенности микроорганизма, когда представители нормофлоры могут обладать подобными свойствами?
2. В разделе изучения видового состава микроорганизмов, выделенных из секрета молочных желез коров, автор не приводит абсолютные числовые значения выделенных видов микроорганизмов, сравнивая их между собой по частоте встречаемости только в процентном соотношении, что может повлиять на объективность сделанных выводов. Выделяла ли автор при маститах и эндометритах у коров актуальные патогены – *Trueperella ruogenes*?
3. В представленной работе, как в материалах и методах, так и в описании результатов собственных исследований, автор не конкретизирует, по какому принципу формировались опытные группы для изучения видового разнообразия микроорганизмов. Также реализация первой задачи по изучению видового состава микроорганизмов, выделенных из разных биотопов здоровых животных и при инфекционно-воспалительных заболеваниях эндогенной природы не нашла достаточного отражения в выводах.



4. Согласно современным концепциям, раскрывающим взаимоотношения между макро- и микроорганизмами, предопределяющая роль в контроле над развитием эндогенных заболеваний отводится неспецифическим факторам иммунитета. На чем основывается автор, утверждая, что выделенные в ходе исследований штаммы микроорганизмов являются этиологически значимыми без изучения иммунного статуса животных и доказательства этиологической, а не патогенетической роли представителей микробиоты? Проводились ли дифференциально-диагностические исследования по исключению вирусов, микоплазм, протистов, а в случаях наружных отитов у собак еще и клещей?
5. Как автор обосновывает практическую значимость создания регрессионной математической модели с целью прогнозирования заболевания, основанного на изучении основных факторов персистенции, учитывая сложность и длительную продолжительность исследований данных признаков *in vitro*? Какие преимущества представленной разработки определяют ее перспективное внедрение?

К числу замечаний, возникших при прочтении диссертации, можно отнести некоторые грамматические и стилистические ошибки. Например, употребление оборота «симбиотическая (комменсальная) микробиота» содержит не синонимичные понятия. Само понятие «условно-патогенные микроорганизмы» является дискуссионным, т.к. не гармонизировано с биологическими свойствами этой группы бактерий (являющихся вирулентными, как минимум, для лабораторных моделей).

Приведённые вопросы носят уточняющий характер и не умаляют достоинств данной научной работы, как полностью соответствующей требованиям и критериям действующего положения о порядке присуждения ученых степеней.

### **Заключение.**

Диссертационная работа Татьяны Михайловны Пашковой на тему «Роль факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов в инфекционном процессе», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований, осуществлено решение научной проблемы (установлена роль персистентных свойств микроорганизмов при факторных инфекциях животных, разработаны новые подходы к прогнозированию течения болезни и определению терапии), имеющей существенное значение для ветеринарной медицины, а, именно, ветеринарной микробиологии, и

соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями). Автор работы заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,  
профессор кафедры биологии и патологии мелких домашних, лабораторных и экзотических животных, декан ветеринарно-биологического факультета ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина), профессор,  
почетный работник АПК РФ, профессор РАН

Н.В. Пименов

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23  
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина  
Тел. 8 (916)261-77-47, e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

Подпись профессора Н.В. Пименова заверяю.

Ученый секретарь ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина,  
доцент Маркин С.С.

23.11.2018

