

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 26.05.2023 г. № 11
о присуждении Хаптановой Наталье Маркеловне, гражданину РФ, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка питательной среды для культивирования
листерий и технологии производства сыворотки листериозной
агглютинирующей» по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6.
Биотехнология принята к защите 23.03.2023 г. (протокол заседания № 6)
диссертационным советом 64.1.002.01, созданным на базе Федерального
бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации,
142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А»,
д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Хаптанова Наталья Маркеловна, 1981 г. рождения, в 2003 г.
окончила Восточно-Сибирский государственный технологический университет
по специальности «Биотехнология», работает младшим научным сотрудником в
отделе биологического и технологического контроля Федерального казенного
учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего
Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека.

Диссертация выполнена в научно-производственном отделе и
лаборатории питательных сред Федерального казенного учреждения
здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-

исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор (1.5.11. Микробиология, 3.2.2. Эпидемиология) Балахонов Сергей Владимирович, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, директор.

Официальные оппоненты:

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, главный эксперт,

Маркова Юлия Александровна, доктор биологических наук (1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория растительно-микробных взаимодействий, заведующая лабораторией,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ростов-на-Дону, в своем положительном отзыве, подписанном Мазрухо Алексеем Борисовичем, кандидатом медицинских наук, ведущим научным сотрудником, и.о. заведующего лабораторией питательных сред, указала, что диссертационная работа Хаптановой Натальи Маркеловны на тему «Разработка питательной среды для культивирования листерий и технологии производства сыворотки

листериозной агглютинирующей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с разработкой питательной среды для культивирования листерий на основе панкреатического гидролизата сороги (вид лучепёрых рыб из семейства карповых) и оптимизацией технологии производства сыворотки листериозной для реакции агглютинации, что важно для микробиологии и биотехнологии. По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Хаптанова Наталья Маркеловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Соискатель имеет **36** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **18** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **4** работы, зарегистрирована **1** База данных, получен **1** патент на изобретение, **4** работы опубликованы в других изданиях и **10** тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций. Общий объем работ – 9 п. л. Недостоверных сведений в опубликованных работах не содержится. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Остяк, А.С. Сравнительный анализ состава питательных основ методом спектроскопии ЯМР / А.С. Остяк, И.А. Ушаков, **Н.М. Хаптанова**, Н.Г. Гефан, В.И. Кузнецов, Е.Н. Оборина, С.Н. Адамович, Е.И. Иванова, И.Б. Розенцвейг // **Изв. ВУЗов. Прикл. Хим. Биотехнол.** – 2019. – Т. 9, № 3. – С. 430–438. ВАК, ИФ РИНЦ = 0,51, Цит. = 1.

2. **Хаптанова, Н.М.** Сравнительная оценка гидролизатов как основы при конструировании питательной среды для культивирования *Listeria monocytogenes* / **Н.М. Хаптанова**, А.С. Остяк, С.В. Лукьянова, В.И. Кузнецов, Н.М. Андреевская, С.Н. Адамович, И.А. Ушаков, С.В. Юденич, С.В. Балахонов // **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2021. – Т. 98, № 4. – С. 481–485. ВАК, ИФ РИНЦ = 0,697.

3. Гефан, Н.Г. Подбор питательной основы и экспериментальная оценка качества бактериологической питательной среды для культивирования листерий / Н.Г. Гефан, С.В. Лукьянова, **Н.М. Хаптанова**, В.И. Кузнецов, Ж.А. Коновалова, Н.М. Андреевская, А.С. Остяк, Е.Ю. Киселева, В.С. Косилко // **Изв. Иркутск. Гос. Универ. Сер: Биол. Экол.** – 2021. – Т. 37. – С. 31–42. ВАК, ИФ РИНЦ = 0,323.

4. **Хаптанова, Н.М.** Получение и оценка эффективности диагностической агглютинирующей сыворотки для идентификации возбудителя листериоза / **Н.М. Хаптанова**, Н.М. Андреевская, Ж.А. Коновалова, Н.Г. Гефан, С.В. Лукьянова, А.С. Остяк, Н.Н. Карцев, В.Н. Борзенков, С.В. Балахонов // **Изв. Иркутск. Гос. Универ. Сер: Биол.** ВАК, ИФ РИНЦ = 0,323, Цит. = 1.

5. **Хаптанова, Н.М.** База данных: Питательные среды для культивирования, выделения и идентификации листерий / **Н.М. Хаптанова**, В.И. Кузнецов, О.Н. Ивашкова, Н.Г. Гефан, А.С. Остяк, С.В. Лукьянова, С.В. Балахонов // Св. о регистрации базы данных 2020621065, 25.06.2020. Заявка № 2020620898 от 09.06.2020. Оpubл. 25.06.2020. – Бюл. № 7.

6. **Пат. RU 2767782 C1** Питательная среда для получения биомассы листерий / В.И. Кузнецов, **Н.М. Хаптанова**, Н.Г. Гефан, О.Н. Ивашкова, А.С. Остяк, В.С. Косилко, С.В. Балахонов // 21.03.2022. Заявка № 2021116115 от 02.06.2021 Оpubл. 21.03.2022. – Бюл. № 9.

На диссертацию и автореферат поступило **6** положительных отзывов от: **(1)** канд. биол. наук **Овчинниковой Марии Владимировны**, зав. отделом диагностических препаратов Российского противочумного института «Микроб», г. Саратов, и д-ра биол. наук, профессора **Никифорова Алексея Константиновича**, зам. директора по экспериментальной и производственной работе того же учреждения, содержит замечания: «в таблицах 1, 2 отсутствует доверительный интервал; не обосновано применение комплекса антиген-антитело в качестве антигенного материала при иммунизации животных-продуцентов с целью получения иммунных сывороток; не приведена себестоимость сконструированной питательной среды на основе

панкреатического гидролизата сороги, отсутствуют технико-экономические критерии оценки эффективности ее применения, что подразумевает паспорт специальности «Биотехнология»; (2) канд. биол. наук, доцента **Захаровой Ирины Борисовны**, ведущего научного сотрудника лаборатории патогенных буркхольдерий Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, г. Волгоград – без замечаний; (3) д-ра биол. наук **Жарниковой Ирины Викторовны**, ведущего науч. сотрудника научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Ставропольского научно-исследовательского противочумного института, г. Ставрополь – без замечаний; (4) канд. мед. наук **Цогбадраха Нямдоржа**, директора Национального центра по изучению зоонозных инфекций, г. Улан-Батор, Монголия, – без замечаний; (5) д-ра биол. наук, профессора **Абидуевой Елены Юрьевны**, ведущего научного сотрудника лаборатории микробиологии Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН, г. Улан-Удэ – без замечаний; (6) канд. мед. наук **Карноуховой Ольги Геннадьевны**, доцента кафедры патологической физиологии и клинической лабораторной диагностики Иркутского государственного медицинского университета, г. Иркутск – без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук **Саяпина Лидия Васильевна** является признанным специалистом в области микробиологии особо опасных инфекций и биотехнологии иммунобиологических препаратов и медицинских изделий, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Хаптановой Н.М. (**Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2018. – № 1. – С. 98–102; 2018. – № 3. – С. 40–45; 2019. – № 3. – С. 87–93; 2020. – № 1. – С. 69–75; 2020. – № 2. – С. 91–97; 2022. – Т.3. – С. 137–144; **Биопреп. Профил. Диагн. Лечение.** – 2018. - Т. 18, № 1 (65). - С. 42-49; 2021. – Т. 21, № 4. – С. 234–243; **Vaccines.** – 2019. – Т.7, № 2. – С. 36; **Иммунология.** – 2018. – Т. 39, № 5-6. - С. 299–304);

доктор биологических наук **Маркова Юлия Александровна** является признанным специалистом в области культивирования микроорганизмов, изучения образования биопленок возбудителей инфекций и антимикробного действия лекарственных препаратов, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Хаптановой Н.М. (**Вавил. Журн. Генетики Селекции.** – 2022. – Т. 26, № 6. – С. 568–574; **Изв. Вузов. Прикл. Хим. Биотехнол.** – 2022. – Т. 12, № 2 (41). – С. 299–309; **Acta**

Biomed. Scient. – 2022. – Т. 7, № 3. – С. 38–46; 2022. – Т. 7, № 5-1. – С. 119–128; **Хим. Интерес. Устойчив. Развиг.** – 2021. – Т. 29, № 1. – С. 21–26; **Прикл. Биохим. Микробиол.** – 2018. – Т. 54, № 1. – С. 3–15; 2021. – Т. 57, № 4. – С. 394–401; **Теорет. Прикл. Экол.** – 2021. – № 2. – С. 156–162; **Тихоокеан. Мед. Журн.** – 2020. – № 1 (79). – С. 32–35; **Хим. Растит. Сырья.** – 2018. – № 4. – С. 149–157; **Изв. Ирк. Гос. Ун-га. Сер. Биол. Экол.** – 2018. – Т. 26. – С. 3–17).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения особо опасных инфекций, разработки питательных сред и диагностических препаратов, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Хаптановой Н.М. (**Астрах. Мед. Журн.** – 2021. – Т. 16, № 1. – С. 73–82; 2021. – Т. 16, № 2. – С. 62–70; **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова.** – 2020. – Т. 16, № 2. – С. 18–26; 2020. – Т. 16, № 3. – С. 10–13; 2021. – Т. 17, № 2. – С. 69–74; 2021. – Т. 17, № 3. – С. 60–68; 2021. – Т. 17, № 4. – С. 34–40; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2021. – № 4. – С. 35–45; 2022. – № 3. – С. 107–114; **Изв. Высш. Учебн. Завед. Сев.-Кавказ. Рег. Сер. Естеств. Наук.** – 2021. – № 2 (210). – С. 119-125; **Вест. Пермс. Ун-га. Сер. Биол.** – 2019. – № 4. – С. 426–433), а также наличием ученых, являющихся авторитетными специалистами по теме диссертации Хаптановой Н.М.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработана технология производства гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей, а также питательная среда на основе панкреатического гидролизата сороги для культивирования листерий, обеспечивающая получение биомассы штамма *Listeria monocytogenes* 766 через 24 ч инкубации в S-форме с типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами;

предложен, в качестве перспективной белковой основы при конструировании питательной среды для культивирования листерий, панкреатический гидролизат сороги, содержащий аминокислоты (аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин, гистидин, тирозин, триптофан), которые удовлетворяют питательные потребности листериозного микроба;

доказано, что разработанная оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов с использованием трехкратного введения листериозного иммуногена обеспечивает получение гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей, не нуждающейся в адсорбции гетерологичных антител. Данная схема иммунизации исключает использование полного адьюванта Фрейнда. Длительность иммунизации кроликов-продуцентов составляла 21-22 дня, титр антител сыворотки листериозной агглютинирующей в развернутой реакции агглютинации достигал 1:1600;

введены, на основе экспериментальных исследований, для стабилизации сыворотки листериозной агглютинирующей эффективные стабилизаторы – 3 % сахароза и 1 % тиосульфат натрия, позволяющие сохранять препарат в течение 5 лет.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: физико-химических (внешний вид, растворимость, кислотность (pH), потери в массе при высушивании, содержание аминного азота и прочность студня агаровых сред по Валенту), бактериологических (определение биологических свойств по показателям прорастания, чувствительности и эффективности питательной среды; скорости роста, культурально-морфологических, биохимических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766), биологических (иммунизация на модели кролика породы Chinchilla), серологических (определение чувствительности и специфичности экспериментальной сыворотки листериозной агглютинирующей с помощью методов ориентировочной и развернутой реакций агглютинации со штаммами *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. и гетерологичными микроорганизмами), протеометрических (определение видовой принадлежности штамма *L. monocytogenes* 766, подтверждение масс-спектрометрическим анализом с использованием расширенной базы MALDI Biotyper 3.0), спектроскопических (определение аминокислотного состава панкреатических гидролизатов сельди, минтая, сороги и кальмара методом ЯМР-спектроскопии) и статистических (определение средней величины (M) и ошибки средней арифметической (m),

определение средних арифметических значений титров антител сыворотки листериозной по Е.В. Монцевичюте-Эрингене, среднего геометрического показателя титра антител – по методу Е.П. Тамбовцева);

изложены научно обоснованные рекомендации по получению панкреатического гидролизата сороги, на основе которого разработана питательная среда для культивирования листерий, определена ее специфическая активность по показателям чувствительности ($8,7 \pm 0,6$ КОЕ), скорости роста (24 ч), эффективности ($5,2 \times 10^9$ м.к./мл) и прорастанию микроорганизмов ($131,4 \pm 1,7$ %);

раскрыты особенности процесса иммунизации кроликов-продуцентов в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей, заключающиеся в трехкратном комбинированном введении листериозного иммуногена внутривенно в возрастающих дозах по 6,0, 16,0 и 25,0 млрд. м.к./мл и внутримышечно 500 млн. м.к./мл. с интервалом в три дня, что стимулирует выработку стабильных специфических антител в титре 1:1600;

изучено стабилизирующее действие на сыворотку листериозную агглютинирующую комбинации сахарозы и тиосульфата натрия в концентрациях 3 и 1 %, соответственно, что сохраняет биологическую активность (89,7 % чувствительность и 87,0 % специфичность) сыворотки листериозной агглютинирующей в течение пяти лет;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены: Технические условия ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 от 24.03.2022 г., Промышленный регламент ПР 01898090-015-17 25.05.2017 г. и Инструкция по применению сыворотки листериозной агглютинирующей от 24.03.2022 г. – учрежденческий уровень внедрения;

Промышленный регламент ПР 01898090-020-19 на питательную среду для культивирования листерий 14.11.2019 г. – учрежденческий уровень внедрения;

проведены испытания чувствительности и специфичности сыворотки листериозной агглютинирующей (серия № 44, 03.2018 г.) с использованием изолятов *Listeria* spp., выделенных в РФ в период 2016–2019 гг. на территории

административного центра (г. Москва) и семи субъектов РФ (Московская, Ярославская, Тверская, Орловская, Белгородская, Ростовская и Вологодская области) из объектов окружающей среды (сточные воды, мелкие млекопитающие), пищевых продуктов (мясные и рыбные полуфабрикаты), биоматериала от больных листериозом (околоплодные воды, ликвор больного менингитом) на базе Референс-центра по мониторингу за листериозом (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), протокол от 29.03.2019 г. и Акт внедрения от 29.03.2019 г. - отраслевой уровень внедрения;

получено положительное решение о выдаче патента на изобретение «Питательная среда для культивирования листерий», заявка от 12.01.2015 г. № 2015100675/10(000966), Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020621065 «Питательные среды для культивирования, выделения и идентификации листерий» от 25.06.2020 г. и Патент на изобретение «Питательная среда для получения биомассы листерий» от 21.03.2022 г. RU 2767782 С1 Бюлл. № 9 – федеральный уровень внедрения;

материалы диссертационной работы включены в курс лекций по микробиологии и лабораторной диагностике листериоза в учебном процессе по программам дополнительного профессионального образования на базе отдела подготовки и усовершенствования специалистов при Иркутском научно-исследовательском противочумном институте Роспотребнадзора (акт внедрения от 14.02.2022 г.) - учрежденческий уровень внедрения;

определена перспектива использования сыворотки листериозной агглютинирующей для клинической лабораторной диагностики листериозов и идентификации *L. monocytogenes*;

создана технологическая линия на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора по производству сыворотки листериозной агглютинирующей (Технические условия ТУ 21.20.23-015-01898090-2018 от 24.03.2022 г., Промышленный регламент ПР 01898090-015-17 от 25.05.2017 г.);

представлены Методические рекомендации по верификации статистической достоверности результатов оценки показателей эффективности *in vitro* диагностики, утвержденные директором Иркутского научно-

исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, протокол № 5 от 26.10.2021 г. - учрежденческий уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены с использованием современных методов и средств измерений и приборов, прошедших метрологическую поверку и калибровку, показана воспроизводимость данных в различных условиях;

идея базируется на анализе имеющихся в научной литературе данных отечественных и зарубежных исследователей об особенностях биологических свойств бактерий *L. monocytogenes* и их антигенной структуры, питательных потребностей листериозного микроба, возможностей лабораторной диагностики листериоза, научных основ производства листериозных агглютинирующих сывороток, схем иммунизации животных-продуцентов, способов стабилизации диагностических сывороток.

установлено, что разработанная гипериммунная высокоспецифичная сыворотка листериозная агглютинирующая обладает чувствительностью 89,7 % и специфичностью 87,0 %, что обосновывает возможность ее использования для индикации *L. monocytogenes* в клинической лабораторной диагностике и научных исследованиях;

использованы современные методы обработки данных с помощью пакета программ MS-Excel.

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных данных, определении цели работы и осуществлении выбора путей решения задач, планировании экспериментов, выполнении биологических, бактериологических, физико-химических и серологических исследований, анализе полученных результатов, подготовке материалов для опубликования, представлении устных и стендовых докладов на конференциях различных уровней.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформы, основной идейной линии, концептуальности и взаимосвязи выводов.

На заседании 26.05.2023 г. диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация «Разработка питательной среды для культивирования листерий и технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей» представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539), и принял решение присудить Хаптановой Наталье Маркеловне ученую степень кандидата биологических наук за решение актуальной научно-практической задачи, связанной с разработкой питательной среды для культивирования листерий на основе панкреатического гидролизата сороги и оптимизацией технологии производства сыворотки листериозной для реакции агглютинации, что важно для микробиологии и биотехнологии.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **16** человек, из них **7** докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология и **8** докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **15**, против **1**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель

диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 26.05.2023 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.