

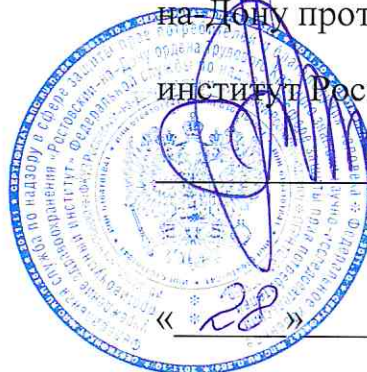
УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ Ростовский-

на-Дону противочумный

институт Роспотребнадзора

А.К. Носков



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической значимости диссертационной работы Хаптановой Натальи Маркеловны «Разработка питательной среды для культивирования листерий и технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11 - микробиология и 1.5.6 - биотехнология

Актуальность темы диссертации

Проблема листериоза является актуальной для многих стран мира в связи с неоднократной регистрацией эпидемических вспышек и спорадических случаев. Листерии распространены повсеместно и, обладая широкими адаптивными возможностями, способны приспосабливаться к существованию в различных условиях и приобретать различные свойства, не

характерные для них (Груздева О.А. с соавт., 2021). Возбудитель листериоза характеризуется адаптационными возможностями в отношении неблагоприятных условий окружающей среды и совокупностью уникальных факторов вирулентности, обуславливающих тяжесть клинических проявлений и высокую летальность. В годы пандемии COVID-19 изменились разнообразие и спектр генотипов *L.monocytogenes* при инвазивном листериозе, появились новые генотипы, ранее не характерные для Российской Федерации (Климова Е.А. с соавт., 2022). *L.monocytogenes* в 99% случаев передается человеку пищевым путем (Scallan E. et al., 2011), в связи с чем контроль пищевых продуктов на наличие возбудителя листериоза является одним из важнейших направлений профилактики этой инфекционной болезни.

Значительный прогресс в области методов обогащения исследуемого материала и конструирования питательных сред для выделения листерий позволяет сделать процедуру выделения и идентификации этого микроорганизма доступной для широкого круга практических микробиологических лабораторий (Арзымбетова Ж.Х., 2011). Несмотря на эффективность ПЦР-анализа как теста экспресс-диагностики *L.monocytogenes* серологические методы в лабораторной диагностике листериоза полностью сохраняют свое значение. Среди них наибольшее распространение получила реакция агглютинации (РА), которая применяется для идентификации культур с помощью специфической агглютинирующей сыворотки.

Важнейшим технологическим этапом получения агглютинирующей сыворотки для РА является иммунизация лабораторных животных-продуцентов. Успешное осуществление данного этапа требует использования биомассы культуры *L.monocytogenes*, для накопления которой нужны специальные питательные среды с выраженными ростовыми характеристиками в отношении указанного возбудителя. Используемые в микробиологической практике коммерческие питательные среды для

обогащения, выделения и идентификации листерий производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), ООО Научно-исследовательский центр фармакотерапии (г. Санкт-Петербург) и АО «Микроген» НПО «Питательные среды» (г. Махачкала) содержат в своем составе селективные добавки, замедляющие рост культивируемого штамма, что не позволяют получить биомассу листерий в необходимом количестве.

Основной задачей при конструировании любых питательных сред представляется адекватный выбор питательной основы — белкового гидролизата определенного сырья, являющегося источником азота, а в идеале еще и стимулятором роста соответствующих микроорганизмов.

Диссертантом обоснована перспективность использования в качестве питательной основы среды для накопления биомассы листерий панкреатического гидролизата сороги, обитающей в прибрежной соровой системе озера Байкал и имеющей низкую товарную ценность.

Типовые поливалентные и моновалентные (1 и 2 серотипов) листериозные сыворотки ранее выпускали в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Покров) (Зайцева Е.А. и др., 2014). Несмотря на имеющиеся технологические разработки, в настоящее время серийного производства этих препаратов в нашей стране нет. Отсутствие в Государственном реестре медицинских изделий сывороток листериозных агглютинирующих подтверждает необходимость проведения исследований, направленных на их создание, постановку на производство и внедрение в микробиологическую практику.

С учетом изложенного тема диссертационной работы Натальи Маркеловны Хаптановой «Разработка питательной среды для культивирования листерий и технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей», цель которой заключается в разработке

состава питательной среды для культивирования листерий на основе панкреатического гидролизата сороги и оптимизации технологии производства сыворотки листериозной для реакции агглютинации, несомненно, актуальна и соответствует требованиям науки и практики.

Новизна полученных результатов и выводов диссертации заключается в разработке и защите патентом на изобретение «Питательная среда для получения биомассы листерий» от 21.03.2022 г. № RU 2767782 С1 новой питательной среды на основе панкреатического гидролизата сороги для получения биомассы *L.monocytogenes* 766, используемой в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей.

Впервые, с использованием микробиологических, биохимических методов и ЯМР-спектроскопии, показано, что панкреатический гидролизат сороги является полноценной питательной основой для культивирования листерий при конструировании указанной питательной среды.

Новыми являются данные, показывающие преимущество разработанной на основе панкреатического гидролизата сороги питательной среды для получения биомассы *L. monocytogenes* 766 перед питательными средами на основе гидролизатов из другого рыбного сырья.

Впервые разработана оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов, позволяющая в короткие сроки (21-22 дня) получить гипериммунную высокоспецифичную сыворотку листериозную агглютинирующую без адсорбции гетерологичных антител.

Впервые подобрана и количественно оптимизирована комбинация стабилизаторов сыворотки листериозной агглютинирующей, позволяющая сохранять препарат в течение 5 лет с высокими титрами антител к *L. monocytogenes*.

Бесспорной новизной диссертации является разработанная база данных «Питательные среды для культивирования, выделения и идентификации

листерий», на которую получено свидетельство о государственной регистрации № 2020621065 от 25.06.2020 г.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов. Теоретическая значимость настоящей работы заключается в том, что впервые дано научное обоснование и представлены экспериментальные доказательства преимуществ панкреатического рыбного гидролизата сороги с высоким содержанием аминного азота и слабощелочной реакцией перед другими исследованными гидролизатами из рыб и морепродуктов в аспекте создания на их основе питательной среды для накопления биомассы листерий. Сконструированная на основе разработанного белкового гидролизата питательная среда позволяет получить в достаточном количестве биомассу штамма *L. monocytogenes* 766 с заданными свойствами с целью производства сыворотки листериозной агглютинирующей. Предложенная автором технология позволила получить гипериммунную сыворотку листериозную для реакции агглютинации, характеризующуюся высокой чувствительностью и специфичностью, что определяет перспективу ее успешного применения для индикации *L. monocytogenes* в клинической лабораторной диагностике и научных исследованиях.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в разработке питательной среды для получения биомассы листерий и технологии производства медицинского изделия «Сыворотка листериозная агглютинирующая», на которые оформлены комплекты нормативной и эксплуатационной документации. Проведены технические испытания сыворотки листериозной агглютинирующей на базе ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники» Росздравнадзора, получен протокол технических испытаний от 30.06.2017 г. № П-15-230 и акт оценки результатов технических испытаний медицинского изделия от 30.06.2017 г. № П-15-230. По результатам клинических испытаний указанного медицинского изделия на базе

аккредитованного испытательного центра - ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (г. Саратов), проведенных в сентябре 2021 г., получено положительное заключение, что подтверждено актом и протоколом клинических испытаний МИ для диагностики *in vitro*.

Была также проведена оценка эффективности применения сыворотки листериозной агглютинирующей по показателям чувствительности и специфичности 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), получены протокол и акт внедрения от 29.03.2019 г., утвержденные директором ФБУН ГНЦ ПМБ.

Наряду с вышеизложенным материалы диссертационной работы включены в курс лекций по микробиологии и лабораторной диагностике листериоза в учебном процессе дополнительного профессионального образования на базе отдела подготовки и усовершенствования специалистов при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 14.02.2022 г.). Разработаны Методические рекомендации по верификации статистической достоверности результатов оценки показателей эффективности *in vitro* диагностики, утвержденные директором ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол от 26.10.2021 г. № 5.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключения. Положения, выносимые на защиту, выводы и заключение

диссертации обоснованы и отражают результаты проделанной работы. О достоверности полученных результатов свидетельствует значительный объем проведенных исследований с применением современных бактериологических, серологических, биологических, протеометрических, спектроскопических методов на аттестованном испытательном лабораторном оборудовании и с применением средств измерений, прошедших метрологическую поверку, а также адекватно выбранные и грамотно примененные методы статистической обработки.

Все разделы диссертации, раскрывающие научную новизну, теоретическую и практическую значимость, объект, структуру исследований, получение, анализ и обобщение результатов, формулировка выводов, апробация, внедрение в практику разработанной питательной среды и сыворотки листериозной агглютинирующей выполнены лично автором.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом. Диссертационная работа Н.М. Хаптановой выполнена в ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках плановой научной темы 011-2-16 «Технология получения питательной среды для культивирования листерий и получение агглютинирующей листериозной сыворотки» № ГР АААА-Б19-219022890019-5 (2016-2017 гг.).

Рукопись диссертации Н.М. Хаптановой оформлена традиционно. Диссертация изложена на 157 страницах, иллюстрирована 11 рисунками, 23 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы исследования», двух глав собственных исследований, заключения, выводов, 11 приложений, списка использованной литературы, включающего 237 источников, в том числе 94 зарубежных. Материал изложен четко, литературным языком, стилистически грамотно, аргументированно и доходчиво для читателей.

Раздел «Введение» содержит основную информацию о проделанной работе. В нем диссертант обосновывает актуальность выполнения работы, степень разработанности проблемы, цель и задачи исследования, отражает научную новизну, практическую значимость, уровень внедрения результатов, приводит данные об опубликованных работах, структуре и объеме диссертации, представляет выносимые на защиту основные положения.

В главе «Современные аспекты лабораторной диагностики листериоза (обзор литературы)» автор приводит информацию о биологических свойствах, антигенной структуре возбудителя листериоза - *L. monocytogenes*, освещает вопросы разработки и производства листериозных агглютинирующих сывороток, их стабилизации. В обзоре также представлены литературные данные о питательных потребностях листерий. Уделено внимание различным аспектам лабораторной диагностики листериоза.

Собственные исследования диссертанта выполнены с применением представленных в главе «Материалы и методы исследований» современных бактериологических, серологических, биологических, протеометрических, спектроскопических методов. В исследовании использовано 56 штаммов ПБА III-IV групп патогенности, в том числе 32 штамма *L. monocytogenes*, 18 штаммов *Listeria spp.* и 6 гетерологичных штаммов. Для получения корпускулярного антигена и при конструировании питательной среды для культивирования листерий использован референс-штамм *L. monocytogenes* 766. Существенное внимание автор уделяет статистической обработке полученных результатов, включающей определение средней величины (M) и ошибки средней арифметической (m) с помощью программы Microsoft Excel 2016 (Microsoft), критерия параметрической статистики Стьюдента при $p < 0,05$. При оценке антигенных свойств сыворотки листериозной титры антител были выражены в средних арифметических величинах по Е.В. Монцевичюте-Эрингене (1964), а средний геометрический показатель титра антител – по методу Е.П. Тамбовцева (1969).

На первом этапе исследований автором была проведена разработка питательной среды для культивирования листерий. Проведено сравнительное изучение динамики накопления аминного азота в процессе панкреатического гидролиза сельди, минтая, сороги и кальмара. Методом ЯМР-спектроскопии определены свободные аминокислоты в панкреатических гидролизатах исследованных видов рыб и морепродуктов.

Автором было убедительно продемонстрировано, что питательной основой, перспективной для конструирования экспериментальной среды культивирования листерий, является панкреатический гидролизат сороги. По показателям стабильности основных биологических свойств культивируемого тест-штамма *L. monocytogenes* 766, прорастания, чувствительности, скорости роста и эффективности питательная среда на основе данного белкового гидролизата превосходит остальные варианты.

Сравнительное изучение трех сконструированных версий питательной среды для получения биомассы листерий показало, что наиболее перспективной является питательная среда версии № 3 на основе панкреатических гидролизатов сороги и отходов производства мясной воды, которая обеспечивает получение биомассы *L. monocytogenes* 766 через 24 ч инкубации в S-форме с типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Данная версия получила название среды для культивирования листерий (СКЛ). Установлено, что питательная среда СКЛ сохраняет культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства производственного тест-штамма *L. monocytogenes* 766 в течение 12 мес.

Второй этап исследований был посвящен разработке технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей. Получен инактивированный корпускулярный антиген (иммуноген) из биомассы *L. monocytogenes* 766, выращенной на питательной среде СКЛ. Иммуноген применяли при иммунизации кроликов-продуцентов в производстве

сыворотки листериозной агглютинирующей. Для получения сыворотки проводили иммунизацию кроликов по двум схемам: с применением полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) (SigmaAldrich, США) и без ПАФ. Из двух схем иммунизации кроликов-продуцентов выбрана вторая схема с применением трехкратного комбинированного введения листериозного иммуногена внутривенным и внутримышечным способами. Сыворотка листериозная агглютинирующая, полученная по второй схеме иммунизации не требует адсорбции гетерологичных антител и видоспецифична.

Была проведена оценка стабильности сыворотки листериозной и определение наиболее эффективных стабилизаторов из четырех препаратов: сорбит – 2,5 %, поливинилпирролидон – 1 %, сахароза – 3 % и тиосульфат натрия – 1 %. Стабильность сыворотки определяли в изотермическом тесте на «ускоренное старение» антител на 50 % в течение всего срока наблюдения по методике Р. Jemeson (1979). Оценивали также влияние исследованных стабилизаторов на pH, остаточную влажность и растворимость сывороток.

Полученные данные показали возможность применения в качестве стабилизатора сыворотки листериозной смеси сахарозы и тиосульфата натрия. Концентрация сахарозы может варьировать от 2,2 до 3,0 %, тиосульфата натрия – от 0,75 до 1,00 %. В производстве сыворотки листериозной выбраны стабилизаторы и их концентрации – 3 % сахароза и 1 % тиосульфат натрия.

По результатам долгосрочных испытаний сыворотки листериозной подтвержден регламентированный срок годности медицинского изделия – 5 лет при температуре 6 ± 2 °С. Методом «ускоренного старения» антител с применением программы «МНК и регрессионный анализ Онлайн+графики» спрогнозирован полный срок годности сыворотки листериозной агглютинирующей до 7 лет.

Весомым результатом проведенного исследования явилась разработка технологической схемы производства сыворотки листериозной

агглютинирующей, включающей 9 технологических процессов, технических условий на нее (ТУ 21.20.23- 015-01898090-2018) и промышленного регламента (ПР 01898090-015-17).

Высокая диагностическая эффективность сыворотки листериозной агглютинирующей была продемонстрирована в ходе ее испытаний по чувствительности и специфичности с использованием 28 штаммов *L.monocytogenes*, выделенных из клинического материала и объектов окружающей среды на территории административного центра (г. Москва) и семи субъектов РФ (Московская, Ярославская, Тверская, Орловская, Белгородская, Ростовская и Вологодская области). По результатам проведенных испытаний установлено, что исследуемая сыворотка листериозная обладает высокой чувствительностью, истинная доля сероположительных случаев составила 89,7 %.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации и дает представление о проделанной работе.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. По теме диссертации автором опубликованы 18 научных работ, из них четыре — в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденного ВАК Министерства науки и высшего образования РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2019); 23th International

scientific conference «Current issues on zoonotic diseases» (Mongolia, 2019); научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за особо опасными и природно-очаговыми инфекционными болезнями» (Иркутск, 2019); XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Екатеринбург, 2021); XV Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (Иркутск, 2021); 24th International scientific conference «Current issues on zoonotic diseases» (Mongolia, 2021); VI Всероссийской научно-практической конференции "Биотехнология в интересах экологии и экономики России» (Улан-Удэ, 2022), а также на научных конференциях ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Иркутск, 2018-2019).

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Полученные в ходе исследования результаты и выводы могут быть использованы при проведении лабораторной диагностики листериоза для идентификации возбудителя данной инфекционной болезни, а также в практике производства медицинского изделия «Сыворотка листериозная агглютинирующая». Разработанная питательная среда для культивирования листерий в перспективе может найти практическое применение не только для накопления биомассы *L.monocytogenes* с целью получения карпускулярного антигена, но и в научных исследованиях по изучению и расширенной характеристике различных штаммов возбудителя листериоза. Также в дальнейшем целесообразно провести исследования возможности использования разработанного автором панкреатического гидролизата сороги в качестве

питательной основы сред для выделения, культивирования и идентификации других микроорганизмов.

Заключение.

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 и оптимизацией технологии производства сыворотки листериозной для реакции агглютинации, что важно для современных 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», установленного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 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.

Отзыв ведущей организации обсужден и одобрен на заседании ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, протокол от 28.04.2023 г. № 7.

Ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией питательных сред отдела диагностических препаратов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, кандидат медицинских наук

Мазрухо Алексей Борисович

Подпись кандидата медицинских наук Мазрухо А.Б. заверяю

Начальник отдела кадров Стоян Елена Евгеньевна



Сведения о ведущей организации

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

(ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)

М. Горького, ул., д. 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, тел.: 8 (863) 240-27-03; факс: 8 (863) 267-02-23; E-mail: plague@aaanet.ru .