

ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию Хаптановой Натальи Маркеловны
**«РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ЛИСТЕРИЙ И ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СЫВОРОТКИ
ЛИСТЕРИОЗНОЙ АГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ»,**
представленную на соискание степени кандидата биологических наук по
специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертации

Листериоз – инфекционное сапро-зоонозное заболевание человека и животных, вызываемое патогенными видами листерий. Листерии широко распространены в природе, их основным резервуаром являются грызуны, которые играют важную роль в контаминации почв, растений и поверхностных водоемов. Листерии весьма устойчивы во внешней среде, хорошо сохраняются и размножаются при пониженных температурах, в условиях овощехранилищ, бытовых и промышленных холодильников. К возбудителю листериоза восприимчиво все население, однако для возникновения заболевания необходимы определенные условия. Одним из таких условий является наличие иммунодефицитных состояний, обусловленных заболеванием или особенностями состояния организма (возраст, беременность). Именно поэтому группами наибольшего риска являются беременные женщины, новорожденные дети, пожилые люди и люди с иммунодефицитом (Ковалев и др. 2019). У таких людей листериоз протекает с поражением нервной системы или в ангинозно-септической форме.

В практике лабораторной диагностики для индикации возбудителя востребованы серологические методы исследования листериоза. Поэтому

разработка технологии получения сыворотки листериозной агглютинирующей является чрезвычайно актуальной.

Содержание диссертации, ее завершенность.

Представленная диссертационная работа является законченным исследованием, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованных литературных источников. Диссертация изложена на 157 страницах, содержит 23 таблицы и иллюстрирована 11 рисунками. Список литературы включает 237 источников, из них 94 на иностранных языках.

Цель исследования заключалась в разработке состава питательной среды для культивирования листерий на основе панкреатического гидролизата сороги и оптимизации технологии производства сыворотки листериозной для реакции агглютинации.

Для достижения цели были сформулированы 5 задач, которые логично вытекают из поставленной цели работы.

Во введении отмечена актуальность выбранной темы исследования, сформулированы цель и задачи, определена научная новизна, теоретическая и практическая значимость, представлены защищаемые положения.

Обзор литературы состоит из шести разделов. Они посвящены особенностям биологических свойств *Listeria monocytogenes*, их антигенной структуре, получению листериозных агглютинирующих сывороток, их стабилизации, питательным потребностям листерий и лабораторной диагностике листериоза.

В главе «Материалы и методы» автор представляет методические приемы исследований. Достоверность научных положений подтверждается достаточным объемом выполненных исследований и их статистической обработкой.

Глава 3 посвящена конструированию питательной среды для культивирования листерий. Автор отмечает, что перспективным и рентабельным сырьем для питательных сред является панкреатический гидролизат рыб. При изучении физико-химических показателей панкреатических гидролизатов (ПГ) из рыбного сырья (сельдь, минтай, сорога) и морепродукта (кальмар) установлено наличие 12 аминокислот. На основе ПГ были сконструированы четыре варианта среды, которые использовали для оценки ростовых свойств и влияния на биологические свойства *L. monocytogenes* 766. Установлено, что по стабильности основных биологических свойств культивируемого тест-штамма, проращению, чувствительности, скорости роста и эффективности питательная среда на основе ПГ сороги превосходит остальные варианты. На следующем этапе исследования было проведено сравнение с питательной средой на основе мясной воды и показано, что питательная среда на основе ПГ сороги обеспечивает получение биомассы *L. monocytogenes* 766 через 24 ч инкубации в S-форме с типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами, что важно для ее дальнейшего использования при получении листериозных агглютинирующих сывороток.

В четвертой главе представлены результаты разработки технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей. В данной главе автор представил результаты двух схем иммунизации кроликов породы шиншилла, оценил стабильность физических свойств и чувствительность полученных сывороток. В изотермическом тесте на «ускоренное старение» антител в сыворотке листериозной установлено, что наилучшим стабилизирующим действием обладала комбинация 3 % сахарозы и 1 % тиосульфата натрия. Показано, что срок годности сыворотки листериозной агглютинирующей составил 5 лет при температуре хранения 6 ± 2 °C. На основании результатов проведенных исследований разработана технологическая схема производства сыворотки листериозной агглютинирующей, состоящая из девяти стадий. Важным достоинством работы является апробация сыворотки на базе Референс-

центра по мониторингу за листериозом (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), которая показала ее высокую эффективность и возможность использования в клинической диагностике.

В разделе «Заключение» автор обобщает и анализирует полученные результаты.

Выводы, сделанные автором, полностью соответствуют поставленной цели, задачам и содержанию работы.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научные положения работы, сформулированные в диссертации, базируются на достаточном объеме проведенных исследований, которые соответствуют поставленной цели и отражают решение поставленных задач.

Все исследования проведены в испытательном лабораторном центре ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (аттестат аккредитации №РОСС RU.0001.517955), с использованием аттестованного оборудования и контрольно-измерительных приборов, прошедших метрологическую поверку.

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на научных конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ: 4 из них в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов на соискание ученой степени кандидата наук.

Полученные диссертантом результаты легли в основу методических рекомендаций и патентов. Разработана нормативно-техническая документация для производства сыворотки листериозной агглютинирующей.

Новизна исследования, значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Автором впервые показано, что панкреатический гидролизат сороги является полноценной питательной основой для культивирования листерий при конструировании питательной среды. Разработана оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов, позволяющая в короткие сроки (21-22 дня) получить гипериммунную высокоспецифичную сыворотку листериозную агглютинирующую без адсорбции гетерологичных антител.

Впервые на основе экспериментальных исследований для стабилизации сыворотки подобрана эффективная комбинация стабилизаторов и их концентрации (3 % сахара и 1 % тиосульфат натрия), позволяющие сохранять препарат в течение 5 лет с титрами антител (1:400) к *L. monocytogenes*.

Таким образом, Н. М. Хаптановой разработан весь цикл производства сыворотки листериозной агглютинирующей: от сред для накопления биомассы листерий, до схемы иммунизации кроликов и сроков хранения полученной сыворотки. Полученные результаты являются важным вкладом в развитие лабораторной диагностики листериоза.

Автореферат диссертации составлен в соответствии с требованиями ГОСТ Р7.0.11-2011. Содержание автореферата достаточно полно раскрывает сущность проблемы и отражает основные положения диссертации.

Вопросы и замечания:

1. В тексте диссертации следовало использовать биологическое наименование сороги – плотва обыкновенная.
2. Почему не был проведен анализ содержания тяжелых металлов в панкреатическом гидролизате сороги, которые, как известно, содержатся в тканях этих рыб (Гомбоева, Пронин, 2007). Могут ли тяжелые металлы влиять на ростовые и биологические свойства листерий?

3. Раздел 1.1. обзора литературы плохо структурирован
4. Раздел 1.5. обзора литературы логично вытекает из раздела 1.1. и его следовало поставить вторым.
5. В разделе статистические методы исследования отсутствует информация по регрессионному анализу, используемому автором в 4 главе.
6. Почему в панкреатическом гидролизате сороги методом ЯМР установлено 12 аминокислот, а с помощью автоматического аминокислотного анализатора 19? Почему при втором варианте исследования триптофан не обнаружен?
7. Отсутствует рис. 10
8. Из 237 источников литературы только 23 за последние пять лет.

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 законченной научной квалификационной работой, в которой содержится теоретическое обоснование и решение научной задачи по разработке состава питательной среды для культивирования листерий на основе панкреатического гидролизата сороги и оптимизации технологии производства сыворотки листериозной для реакции агглютинации..

По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от

7