

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Хаптановой Натальи Маркеловны на тему «Разработка питательной среды для культивирования листерий и технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям

1.5.11 - Микробиология и 1.5.6 - Биотехнология

Актуальность темы

Листерии известны микробиологам и клиницистам с давних времен. При этом за последние годы возросло число случаев листериоза, протекающих по типу эндокардита, пневмонии, перитонита, холецистита, остеомиелита и др. Наибольшую опасность листериозная инфекция представляет для беременных женщин и новорожденных, вызывая выкидыши, мертворождение, пороки развития плода, а также менингоэнцефалиты, сепсис и пневмонию у новорожденных.

Выраженный полиморфизм клинических проявлений, затрудняющий достоверную клиническую диагностику этого заболевания, приводит к большому числу диагностических ошибок. Помимо клинических данных для диагностики листериоза большое значение имеет выделение и идентификация возбудителя. В связи с этим трудности, связанные с проведением эпидемиологического анализа инфекции, широкое инфицирование листериями пищевых продуктов, высокая частота носительства возбудителя у людей и широкое распространение во внешней среде, обуславливает необходимость совершенствования микробиологической диагностики листериоза, и в первую очередь, требует наличия эффективных диагностических препаратов и питательных сред.

Использование зарубежных диагностических препаратов ограничено из-за их высокой стоимости. Кроме того, должным образом не разработаны методы диагностики листериоза у людей, что оказывает влияние на эффективность эпидемиологического надзора за распространением инфекции. Вместе с тем, при любом сочетании клинических и эпидемиологических данных окончательный диагноз невозможен без выделения возбудителя и его полной идентификации.

В настоящее время в Государственном реестре медицинских изделий Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные листериозные агглютинирующие сыворотки.

В связи с этим, разработка технологии получения сыворотки листериозной агглютинирующей с использованием сконструированной питательной среды для культивирования *L. monocytogenes*, является актуальной задачей.

Научная новизна. Проведенные исследования позволили Наталье Маркеловне получить данные, имеющие несомненную научную новизну и практическую значимость. Впервые на основании полученных результатов экспериментальных и клинических испытаний с учетом питательных потребностей листерий научно обоснована рецептура питательной среды для культивирования листерий на основе панкреатического гидролизата сороги, содержащего аминокислоты (аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин, гистидин, тирозин, триптофан), для получения биомассы *L. monocytogenes* 766, используемого в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей.

Требованиям научной новизны соответствует разработка оптимальной схемы иммунизации кроликов-продуцентов, позволяющая в короткие сроки (21–22 сут)

получить гипериммунную высокоспецифическую сыворотку листериозную агглютинирующую без адсорбции гетерологичных антител.

К приоритетным положениям диссертации следует отнести впервые подобранную эффективную комбинацию стабилизаторов и их концентрации (3 % сахара и 1 % тиосульфат натрия), позволяющие сохранять в препарате титры антител (1:400) к *L. monocytogenes* и обеспечивать стабильность сыворотки листериозной агглютинирующей в течение 5 лет.

Научная новизна подтверждена Патентом на изобретение «Питательная среда для получения биомассы листерий» от 21.03.2022 г. RU 2767782 C1.

Получено положительное решение о выдаче Патента на изобретение «Питательная среда для культивирования листерий» заявка от 12.01.2015 г. № 2015100675/10(000966).

Практическая значимость. Результаты проведенной работы нашли свое отражение при разработке следующих нормативно-методических документов:

- Промышленный регламент (ПР 01898090-015-17) и нормативная документация (Технические условия (ТУ 21.20.23-015-01898090-2018) по производству и контролю сыворотки листериозной агглютинирующей, утвержденные директором учреждения от 04.05.2017 г., протокол № 10 и инструкция по применению медицинского изделия (Приложения 1, 2).

- В соответствии с разработанной программой проведены технические испытания сыворотки листериозной агглютинирующей на объектах окружающей среды и биологического материала в г. Москве и семи субъектах Российской Федерации (Приложения 3, 4) и клинические испытания в ФБУН ГНЦ ПМБ и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (Приложения 5, 6, 7, 8). Полученные результаты протоколов и актов технических и клинических испытаний подтверждают диагностическую ценность препарата.

- Промышленный регламент (ПР 01898090-020-19) по производству питательной среды для культивирования листерий, утвержденный директором учреждения от 14.11.2019 г. (Приложение 9).

- Методические рекомендации по верификации статистической достоверности результатов оценки показателей эффективности *in vitro* диагностики (протокол от 26.10.2021 г. № 5, учрежденческий уровень).

- Получено Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020621065 «Питательные среды для культивирования, выделения и идентификации листерий» от 25.06.2020 г. (Приложение 10).

- Материалы диссертационной работы включены в курс лекций по микробиологии и лабораторной диагностике листериоза на базе отдела подготовки и усовершенствования специалистов при ФКУЗ Иркутский НИПЧИ (акт внедрения от 14.02.2022 г.).

Объем и структура диссертации. 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.

Содержание диссертации, ее завершенность

Во введении диссертации четко обоснованы актуальность исследований; научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования.

В автореферате диссертационной работы Хаптановой Н.М. представлены положения, выносимые на защиту, выводы, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимости, а также перспективы дальнейшей разработки темы.

Литературный обзор (**Глава 1**) состоит из 6 подглав и включает в себя в достаточном объеме анализ литературных источников, касающихся особенностей биологических свойств *L. monocytogenes*, ее антигенной структуре и питательным потребностям листериозного микроба. В последующих подглавах освещены основы производства листериозных агглютинирующих сывороток, схемы иммунизации кроликов-продуцентов, способы стабилизации сыворотки. Особое внимание было уделено анализу лабораторной диагностики листериоза, на основании которого автор установила, что до начала 80-х годов прошлого столетия основными методами лабораторной диагностики листериоза являлось выделение культур на питательных средах, окраска мазков из клинического материала, в сочетании с серологическими методами диагностики (реакция агглютинации).

Вместе с тем, увеличение роста спорадических случаев, эпидемиологических вспышек и отсутствие надлежащих диагностических препаратов выявило необходимость усовершенствования лабораторной диагностики заболевания из-за отсутствия диагностических листериозных сывороток.

В результате проведенного анализа Наталья Маркеловна сделала обоснованный вывод о том, что актуальной проблемой является проведение исследований, направленных на совершенствование методов диагностики листериоза, а именно: создание диагностического препарата, имеющего высокую специфичность, чувствительность и информативностью, а также быть доступным широкому кругу исследователей.

В главе 2 «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых решены поставленные задачи. Работа выполнена на представительном материале (65 штаммов *L. monocytogenes* и 16 гетерологичных штаммов *Listeria*, 455 кроликов породы *Chinchilla*, 10 экспериментально-производственных серий сыворотки листериозной агглютинирующей) с описанием основных материалов и условий проведения экспериментальных исследований. Исползованные методические приемы (бактериологические, биологические, биотехнологические, методы изучения корпускулярного антигена, серологические, ЯМР-спектроскопия, MALDI-TOF масс-спектрометрия, статистические) соответствуют современному уровню, являются широко апробированными, воспроизводимыми и надежными. Объем наблюдений, планирование и проведение экспериментов является адекватным поставленным задачам и достаточным для доказательного статистического анализа.

Результаты исследований обобщены в 2 главах. **В главе 3** (5 подглав) освещены этапы разработки четырех вариантов экспериментальных питательных сред на основе панкреатического гидролизата сельди, минтая, сороги и кальмара – варианты № 1, 2, 3 и 4, соответственно. Проведенная сравнительная оценка специфической активности сконструированных питательных сред показала, что питательная среда

версии № 3 на основе панкреатических гидролизатов сороги и отходов производства мясной воды перспективна по показателям стабильности основных биологических свойств культивируемого тест-штамма *L. monocytogenes* 766 (показатели прорастания микробных клеток, чувствительность, скорость роста и эффективность). Установлено, что питательная среда для культивирования листерий (СКЛ) обеспечивает получение биомассы *L. monocytogenes* 766 в достаточном количестве через 24 ч инкубации в S-форме с типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. При изучении физико-химических показателей СКЛ установлено, что питательная среда представляет собой однородный мелкодисперсный гигроскопичный порошок светло-коричневого цвета; pH – $7,40 \pm 0,02$; аминный азот – $4,83 \pm 0,07$ %; прочность студня среды – $531,00 \pm 13,66$ г; растворимость – в течение 3 мин; прозрачность – легкая опалесценция; потеря в массе при высушивании – $3,75 \pm 0,05$ %. По биологическим показателям качества установлено, что питательная среда СКЛ обеспечивала типичный рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766, диаметр колоний до $3,0 \pm 0,5$ мм.

Кроме того, с использованием метода «ускоренного старения» определен срок хранения разработанной питательной среды без ухудшения биологических показателей в течение 7 лет при температуре хранения 6 ± 2 °C.

Научно обосновано и экспериментально доказано, что питательная среда СКЛ с высоким содержанием аминного азота, слабощелочной реакцией кислотности превосходит питательные основы других исследованных ПГ из рыб и морепродукта по всем показателям перед другими экспериментальными питательными средами, а именно: сохраняет культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства производственного штамма *L. monocytogenes* 766 в течение 12 мес.

Глава 4 (6 подглав) посвящена разработке технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей. На первом этапе работы автор получила и изучила инактивированный корпускулярный антиген (иммуноген) из биомассы *L. monocytogenes* 766, выращенной на питательной среде СКЛ. В дальнейших экспериментах была подобрана оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов без применения полного адьюванта Фрейнда с использованием трехкратного введения листериозного антигена, которая обеспечивает получение гипериммунной высокоспецифичной сыворотки листериозной агглютинирующей, не нуждающейся в адсорбции гетерологичных антител.

В проведенных экспериментах показана высокая чувствительность сыворотки листериозной в развернутой РА, так как специфические титры антител на 21 день после начала иммунизации составили 1:1600. При определении специфичности сыворотки листериозной в ориентировочной и развернутой РА получены отрицательные результаты с близкородственными гетерологичными штаммами.

В процессе работы подобрана эффективная комбинация стабилизаторов и их концентрации (3 % сахара и 1 % тиосульфат натрия), которые сохраняют иммунобиологические (специфические антитела) и основные физико-химические свойства (внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность, pH) сыворотки листериозной агглютинирующей в пределах установленных нормативных требований в условиях хранения при температуре 6 ± 2 °C в течение 5 лет. Помимо этого, предложенное автором внесение данных стабилизаторов после этапа консервации сыворотки листериозной исключает повторную стерилизацию препарата.

Подводя итог проделанной работы, автор обоснованно сделала заключение о том, что полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности сыворотки листериозной агглютинирующей и возможности её применения в

клинической лабораторной диагностике для обнаружения возбудителя листериоза.

В Заключение диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая значимости полученных результатов; последовательно и аргументированно сформулированы итоги исследований.

В Приложении приведены основные документы, подтверждающие новизну и практическую значимость выполненной работы.

Методология диссертационной работы заключалась в изучение микробиологических и иммунологических подходов в производстве медицинских изделий, а именно: питательной среды на основе панкреатического гидролизата сороги и сыворотки листериозной агглютинирующей с использованием биотехнологических приемов и методы лабораторных исследований.

Выводы соответствуют поставленным задачам и отражают сущность работы.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации, соответствует таковому в автореферате диссертации.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность обеспечивается значительным объемом полученных экспериментальных данных, их соответствием теоретическим положениям, статистической обработкой данных экспериментов. Выводы из проведенных исследований теоретически и экспериментально обоснованы и отражают цель и задачи диссертации.

Автореферат диссертации, изложенный на 23 страницах, соответствует содержанию и основным итогам диссертации.

Содержание диссертации в достаточной степени отражено в публикациях автора, в том числе 4 статьях в журналах из списка изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, 4 статьи в прочих изданиях, одной Базы данных и 10 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций, а ее основные положения обстоятельно изложены в автореферате.

Диссертационная работа производит положительное впечатление, написана литературным языком, хорошо читается. Принципиальных замечаний нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, по тексту работы встречаются технические опечатки, не влияют на высокую положительную оценку работы.

По содержанию диссертации к Наталье Маркеловне имеются следующие **вопросы**:

1. Какие требования предъявляются к производственному штамму *L. monocytogenes* 766, использующегося для получения легионеллезной сыворотки (фенотипические и генетические свойства, количество пересевов, условия хранения, срок годности)?
2. Планируется регистрация разработанной сыворотки листериозной агглютинирующей в установленном порядке и в дальнейшем включение ее в нормативные документы (ГОСТ, СанПин и др.) для возможного использования в практическом здравоохранении для диагностики листериоза?

Заключение

Диссертационная работа Хаптановой Натальи Маркеловны на тему «Разработка питательной среды для культивирования листерий и технологии

производства сыворотки листериозной агглютинирующей» является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены новые данные, имеющие несомненную научную новизну и практическую значимость; научно подтверждено использование сконструированной питательной среды с обоснованием питательных потребностей листерий на основе панкреатического гидролизата сороги для получения биомассы штамма *L. monocytogenes* 766, использующегося в производстве сыворотки листериозной агглютинирующей; разработаны оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов и подобрана комбинация стабилизаторов для получения высокоспецифической сыворотки листериозной агглютинирующей без адсорбции гетерологичных антител, имеющие существенное значение в практике лечебно-профилактических учреждений здравоохранения Российской Федерации для обеспечения национальной безопасности в сфере здравоохранения и здоровья нации.

По актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных данных диссертационная работа Хаптановой Н.М. на тему «Разработка питательной среды для культивирования листерий и технологии производства сыворотки листериозной агглютинирующей» отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 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, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Хаптанова Н. М. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент

Главный эксперт
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения» Минздрава России,
доктор медицинских наук

Саяпина

Саяпина Лидия Васильевна

Адрес организации

Юридический адрес:

127051, г. Москва,

Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Тел: +7 495-190-18-1118, доб. 6592

E-mail: Sayapina@expmed.ru

Подпись Саяпиной Л.В. удостоверяю

Главный специалист по кадрам
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

«10» 05 2023 г.



Курышева

Курышева М.А.