

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Червяковой Надежды Сергеевны на тему «Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Государственные коллекции широкого спектра микроорганизмов, в том числе патогенных, являются хранителями генофонда возбудителей инфекционных болезней человека и животных. Одна из важнейших задач коллекционной деятельности заключается в поддержании жизнеспособности микроорганизмов, сохранение стабильности таксономических признаков, а также определенных свойств, представляющих интерес для науки и практики. С момента первых открытий микроорганизмов ученые на основе культурально-морфологических, биохимических, серологических и иммунологических свойств стали разрабатывать схемы их классификации. Однако на ранних этапах коллекционной деятельности существующие методы не позволяли в полной мере определять видовую принадлежность штаммов.

Совершенствование подходов идентификации бактерий свидетельствует о необходимости периодического проведения номенклатурной ревизии коллекционных штаммов с применением современных методов установления аутентичности, основанных на использовании автоматизированных систем биохимического и молекулярно-генетического анализов, определении спектра их видоспецифичных маркеров и уточнения систематического положения.

До настоящего времени остается не решенной в полной мере проблема хранения штаммов. Наиболее распространенным и ставшим уже традиционным способом является поддержание штаммов на плотных или полужидких питательных средах с пересевом культуры не менее одного раза в год. Вместе с тем из-за отсутствия возможности долгосрочной консервации (лиофилизации или криоконсервации), частые пересевы могут приводить к утрате основных свойств культуры. Существующая практика консервации ориентируется, как правило, на создание немногочисленных и специализированных приемов, позволяющих перевести в анабиотическое состояние вегетативные клетки разнообразных микроорганизмов. Одним из оптимальных методов хранения является лиофилизация, обеспечивающая наибольшую стабильность штаммов и позволяющая поддерживать коллекционный фонд в течение длительного времени.

В связи с этим исследования по совершенствованию методических подходов по установлению аутентичности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и оптимизации способов их долгосрочного хранения, являются актуальными.

Диссертация представлена на 177 страницах текста, состоит из введения, главы обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в том числе одной главы с описанием материалов и методов), заключения и выводов. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 28 рисунками. Библиографический указатель содержит 88 отечественных и 163 зарубежных источников.

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований, приведены научная новизна, практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту, сведения об апробации и публикациях. Шесть поставленных задач соответствуют цели работы и положениям, выносимым на защиту. Задачи исследования включают в себя проведение расширенной идентификации штаммов патогенных бактерий на основе изучения их культурально-морфологических, биохимических и генетических свойств;

определения комплекса маркеров аутентичности штаммов по утилизации субстратов, масс-спектрам и риботипам; разработки алгоритма установления аутентичности штаммов; оптимизации процесса их лиофилизации с применением современных сублимационных установок камерного и коллекторного типов.

В главе 1 «Литературный обзор» прослежена эволюция принципов классификации, идентификации и установления аутентичности бактерий. Автором выявлено, что отсутствуют стандартные схемы внутривидовой и внутривидовой идентификации штаммов с применением комплексного подхода и интеграции фенотипических, генетических и филогенетических методов их изучения. Проанализировав литературные источники, Надежда Сергеевна сделала вывод о необходимости оптимизации алгоритма аутентичности штаммов и периодическом проведении номенклатурной ревизии коллекции («ГКПБ» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») с целью уточнения их систематического положения на основании обновляющихся или вновь вводимых признаков.

Особую важность коллекционной деятельности составляет поддержание штаммов в жизнеспособном состоянии с сохранением их типичных свойств в течение длительного времени с использованием различных способов консервации бактерий. В связи с этим выявленные направления исследований и определили актуальность работы.

В главе 2 "Материалы и методы" изложены микробиологические, биохимические, серологические, молекулярно-генетические методы исследования и методы долгосрочной консервации коллекционных штаммов. В работе использовали автоматизированные анализаторы VITEK 2 Compact, RiboPrinter®System, MALDI-TOF масс-спектрометрии, сублимационные камерные и коллекторные установки. Было изучено 130 коллекционных тест-штаммов I-IV групп патогенности, принадлежащих к 23 различным родам и 57 видам: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brucella*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Yersinia*). Объем фактического материала является достаточным для проведения статистической обработки результатов. Для статистической обработки полученных результатов использовали программы BioNumerics v. 7.5 с помощью модулей «Character type», «Fingerprint type», «Spectrum type», методы вариационной статистики [Плохинский, 1970]. Коэффициенты подобия рассчитывались на основе корреляции Пирсона. Кластерный анализ проводили по методу невзвешенного попарного среднего – UPGMA

Глава 3 посвящена определению аутентичности и таксономической принадлежности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, наиболее востребованных в качестве тест-штаммов.

Представлены результаты комплексного исследования аутентичности штаммов с применением традиционных (культурально-морфологические, тинкториальные, биохимические) и современных (геномный и протеомный профили) методов, а также автоматизированных бактериологических и молекулярно-биологических анализаторов (VITEK 2 Compact (Bio-Mérieux, Франция), RiboPrinter®System (DuPont Qualicon, США), MicroFlex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия).

Автором убедительно показано, что ни один из используемых методов не идентифицировал штаммы до вида, так как полученные результаты по некоторым признакам отличались от паспортных данных. По результатам скрининга у 120 штаммов

были подтверждены культурально-морфологические свойства в соответствии с видовыми маркерами, указанными в паспортных данных и требованиям современной систематики, у 10 штаммов рода *Bacillus* обнаружены нетипичные формы колоний на плотной питательной среде. При использовании API® систем и анализатора VITEK 2 Compact получены сопоставимые данные. Установлено, что из 130 штаммов определены биохимические маркеры аутентичности и подтверждена видовая принадлежность у 76 % штаммов. Выявлено расхождение результатов идентификации ряда анализируемых микроорганизмов родов *Brucella*, *Bacillus*, *Shigella*, *Pseudomonas*. Из общего количества штаммов, включая возбудителей особо опасных инфекций и спорообразующих микроорганизмов, анализируемых MALDI-TOF MS, достоверная идентификация до рода или вида была подтверждена в 70 % случаев с коэффициентом соответствия масс-спектров (score value) анализируемых образцов не менее 2,2 со спектрами из электронной библиотеки Bruker Daltonics.

Учитывая, что ни один из использованных методов не позволяет полностью идентифицировать микроорганизмы, Надежда Сергеевна применила метод риботипирования, что позволило значительно повысить информативность идентификации данных культур и способствовало выбору маркеров аутентичности исследуемых штаммов. При этом у 84 % штаммов подтверждено таксономическое положение по признакам, в соответствии с паспортными данными.

Таким образом, в результате проведенных фенотипических, молекулярно-генетических и протеомных исследований, Надеждой Сергеевной установлены маркеры аутентичности коллекционных штаммов, позволяющих комплексно проводить их таксономическую принадлежность.

Несомненный научный и практический интерес представляют сведения, отраженные в главе 4 «Разработка алгоритма установления аутентичности коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов и создании единой системы базы данных для его выполнения». Надежда Сергеевна, основываясь на ранее полученных результатах, разработала алгоритм и единый каталог аналитических данных расширенного спектра фенотипических (ферментативная активность) и молекулярно-биологических (профиль рибосомальных белков и риботип) маркеров обеспечивающих достоверное установление аутентичности изучаемых штаммов микроорганизмов I-IV групп патогенности по четырем основным уровням, с последующим обобщением всех данных в программе BioNumerics.

Следует отметить высокую значимость разработанной единой базы данных для возможности ее использования в коллекционных фондах других учреждений. Согласно предложенному алгоритму установления видовой принадлежности коллекционных штаммов, была проведена коррекция видовых наименований ряда микроорганизмов «ГКПБ» РосНипчи «Микроб». Результатом явилось внесение изменений в паспортные данные коллекционных штаммов. Изучаемые штаммы, не соответствующие установленным свойствам, были исключены из коллекционного фонда.

Известно, что поддержание штаммов, сохранение их типичных родовых и видовых свойств, является основной задачей всех коллекционных центров. Особенно это важно при использовании штаммов в производственной деятельности; формировании панелей референтных и тест-штаммов, применяющихся при разработке и оценке современных средств диагностики.

Следующий важный этап работы овящен в главе 5 «Разработка схемы процесса консервации коллекционных тест-штаммов патогенных бактерий» и касается оптимизации схемы долгосрочной консервации штаммов методом лиофильного высушивания с использованием современных сублимационных установок камерного (Martin Christ Epsilon 2-6D) и коллекторного (Martin Christ Альфа 2-4 LD и НЕТО Power Dry) типов.

Надеждой Сергеевнй изучены факторы, значимые на этапах подготовки консервации штаммов и влияющие на исход в течение их хранения, а также рассмотрены пути совершенствования методов их хранения. В результате проведенной работы автором подобраны условия лиофилизации коллекционных штаммов с помощью установок коллекторного (системы Долинова, Martin Christ Альфа 2-4 LD, НЕТО Power Dry) и камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6. Проведен сравнительный анализ показателей жизнеспособных клеток, выживаемости и прогнозируемых сроках хранения лиофилизированных штаммов патогенных микроорганизмов.

Следует отметить, что автором проведена колоссальная работа по исследованию влияния температурно-временных параметров лиофилизации, оптимального состава лиопротекторов, определение количества жизнеспособных клеток при хранении штаммов и сроков хранения. Даже сложно представить, сколько было израсходовано питательной среды, чашек Петри, сколько произведено высевов на питательные среды!

Для решения поставленных задач лиофилизированные штаммы инкубировали при температурах 25 °С и 37 °С в течение 14 сут и в условиях хранения при температуре 4 °С в течение 12 мес. Установлено, что рассчитанное время снижения количества жизнеспособных бактерий в лиофилизированных препаратах на установке камерного типа в условиях хранения при температуре 4 °С наблюдалось до 1 %, и варьировало в зависимости от видовой принадлежности штамма и состава защитной среды. Для штаммов родов *Vibrio*, *Shigella* этот показатель в среднем составил 2 года, в то время уменьшение количество жизнеспособных клеток *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Yersinia* и *Escherichia* может составить до 1 % в течение 40, 22, 20 и 15 лет, соответственно.

В результате прогнозирования сроков хранения штаммов, лиофилизированных на установках коллекторного типа при температуре 4 °С выявлено, что лактозо-желатиновая и сахарозо-желатиновая среды обеспечивают выживаемость штаммов в течение 21 года и 40 лет. Аналогичные сроки сохранения жизнеспособности микробных клеток со средой СЖА имеет и Среда 4 (до 40 лет), а для микроорганизмов *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella*, *Francisella* - до 16 лет. Полученные результаты, послужили основанием рекомендовать использование установки камерного типа для лиофилизации штаммов, срок хранения которых не превышает 3-4 года, для более длительного поддержания культур - лиофилизацию в установках коллекторного типа.

При оптимизации способа низкотемпературной консервации изучаемых штаммов при температуре минус 70 °С показано, что разработанные условия способствуют получению лиофильно высушенных препаратов высокого качества, подтверждаемое расчетами показателей их жизнеспособности и прогнозируемых сроков хранения, и является перспективным методом поддержания рабочих коллекций референтных штаммов патогенных микроорганизмов.

В заключение диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая значимости полученных результатов.

Научная новизна заключается в том, что впервые по биохимической активности, по молекулярно-генетическому профилю и спектрам рибосомальных белков охарактеризованы 130 штаммов микроорганизмов I-IV групп патогенности, хранящихся в «ГКПБ» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», используемых в производственной и диагностической деятельности.

Требованиям научной новизне соответствует разработанный алгоритм определения аутентичности и систематической принадлежности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, включающий скрининг культурально-морфологических свойств штаммов, определение их ферментативной активности к расширенному количеству дифференцирующих субстратов, установление профиля рибосомальных белков и получения риботипа, с последующей обработкой этих результатов в биоинформационном программном пакете BioNumerics.

Впервые на модели 60 штаммов бактерий, относящихся к 22 родам и 40 видам, хранящимся в «ГКПБ» ФКУЗ «Микроб» Роспотребнадзора, показано, что предложенная автором схема долгосрочной консервации штаммов патогенных микроорганизмов методами лиофилизации на современных сублимационных установках камерного, коллекторного типов и низкотемпературного замораживания, обеспечивает длительное поддержание образцов в жизнеспособном состоянии.

Полученные экспериментальные данные представляют не только научный интерес, но имеют большое практическое значение. Теоретическая значимость работы состоит в получении знаний, формирующих представления о современных подходах к установлению аутентичности штаммов патогенных микроорганизмов и их долгосрочной консервации. Экспериментально доказано, что комплекс маркеров аутентичности, включающий биохимическую активность штамма к дифференциально-диагностическим субстратам, структуру и расположение *rnn*-оперона и профиль рибосомальных белков, обеспечивает создание «молекулярных портретов» микроорганизмов, принадлежащих к 23 родам и 57 видам, позволяющих контролировать их подлинность в процессе хранения и воспроизводства. Разработанные схемы долгосрочной консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов методами лиофилизации и низкотемпературной консервации обеспечивают длительное сохранение их образцов в жизнеспособном состоянии, что подтверждается оценкой выживаемости и жизнеспособности бактериальных клеток, а также рассчитанными прогнозируемыми сроками хранения.

Разработанный алгоритм определения аутентичности и систематической принадлежности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, апробирован в «ГКПБ» ФКУЗ «Микроб» Роспотребнадзора, что позволяет рекомендовать его использование для коллекций других учреждений.

Полученные данные в ходе работы нашли свое отражение в 7 методических рекомендациях, из которых двое утверждены на федеральном уровне:

МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности»;

МР 4.2.0090-14 «Использование методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I-II групп патогенности», утвержденных Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным

государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 24 апреля 2014 г. и 13 мая 2014 г.).

На учрежденческом уровне утверждены:

1. «Методические рекомендации по созданию структуры и заполнению базы данных коллекционных штаммов микроорганизмов на основе программного пакета Bionumerics» (протокол № 2 от 28.04.2016 г.);

2. «Методические рекомендации по установлению аутентичности и систематического положения коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов» (протокол № 4 от 9 июня 2015 г.);

3. МР «Лиофильное высушивание коллекционных штаммов бактерий III-IV групп патогенности на коллекторных лиофилизаторах с холодовым конденсором» (протокол № 8 от 26 декабря 2012 г.);

4. «Методические рекомендации по низкотемпературной консервации возбудителей I-IV групп патогенности при температуре минус 70 °С», (протокол № 2 от 20 апреля 2012 г.);

5. МР «Лиофильное высушивание неспорообразующих возбудителей инфекционных заболеваний III-IV групп патогенности на лиофилизаторе Martin Christ», (протокол № 8 от 23 декабря 2010 г.).

Подготовлены паспорта коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», включающие полученные данные о фенотипических и молекулярно-генетических свойствах патогенов.

Достоверность изложенных в диссертационном исследовании положений, выводов и результатов подтверждена значительным объемом экспериментальных данных с применением современных методических приемов, позволяющих повысить информативность идентификации коллекционных штаммов и сохранить их свойства в течение длительного времени.

Материалы диссертации представлены на Межгосударственных и Всероссийских научно-практических конференциях, съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов», международных конгрессах и др.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы заключается в исследованиях, выполненных в отделе «Государственная коллекция патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в рамках плановой научно-исследовательской темы «Новые диагностические технологии в мониторинге особо опасных инфекционных болезней, индикации возбудителей и расширенном изучении свойств штаммов» (шифр темы 53-2-14, регистрационный номер АААА-А16-116112810064-1). Основные разделы диссертационной работы выполнены лично соискателем, отдельные экспериментальные исследования (п.п 3.3, 3.4 главы 3 диссертационной работы) выполнены совместно на базе отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Материалы исследований отражены в автореферате и 10 печатных работах, из них 4 опубликованы в реферируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах.

По существу замечаний нет. Диссертация написана по четкой логической схеме, легко читается. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, оформлению обозначений и др., не влияют на высокую положительную оценку работы.

К соискателю имеются вопросы. В «ГКПБ» есть штаммы, которые хранятся на полужидких питательных средах? Рассматривается возможность лиофилизации этих

штаммов? Какие штаммы в первую очередь предполагается хранить способом криоконсервации при низкой температуре, что для этого должно быть предусмотрено (морозильные камеры, жидкий азот)? Какие критерии существуют для обновления коллекционных штаммов (их востребованность, окончания срока годности и др.)?

Таким образом, работа Червяковой Н.С. на тему «Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченным самостоятельным исследованием, в котором решена задача методологического подхода, позволяющего повысить информативность идентификации коллекционных штаммов и сохранять их свойств в течение длительного времени, что имеет важное научно-практическое значение. По актуальности, объему, новизне, и практической значимости полученных результатов диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к диссертациям, а ее автор заслуживает присуждению ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 микробиология.

Официальный оппонент

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

Саяпина Л.В.

Юридический адрес:
127051, г. Москва,
Петровский бульвар, д.8, строение 2
Тел: 499-241-91-47,
E-mail: Sayapina@expmed.ru

Подпись д.м.н. Саяпиной Л.В. удостоверяю:

Начальник отдела подготовки кадров
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Макаров А.В.