



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)**

п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, 142279

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>

ОКПО 78095326 ОГРН 1055011113772 ИНН 5077018190 КПП 507701001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ

Академик РАН,

д.м.н., профессор

Дятлов И.А.

2017 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» о научно-практической ценности диссертационной работы Червяковой Надежды Сергеевны «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

Актуальность темы диссертации и ее связь с государственными научными программами, соответствие темы диссертации Положению о присуждении ученых степеней

В Федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015-2020 годы)» отдельным направлением сформулированы работы по усовершенствованию деятельности государственных коллекций патогенных микроорганизмов. Государственные коллекции патогенных микроорганизмов являются национальным достоянием Российской Федерации и обеспечивают необходимую базу для проведения исследований, связанных с такими

научными областями как микробиология, иммунология, биотехнология, сельское хозяйство и медицина.

Подавляющее большинство тест-штаммов, находящихся на хранении в Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», были выделены и описаны в середине XX века, до периода становления современной микробиологической систематики. Несмотря на наблюдаемый в последнее время значительный прогресс в области молекулярно-генетических исследований, в настоящее время в распоряжении исследователей отсутствуют технологии, позволяющие определять полные нуклеотидные последовательности бактериальных хромосом и плазмид. Использование технологий секвенирования методом «дробовика» позволяет получить информацию относительно большей части бактериального генома. Однако, полученные данные носят фрагментарный характер и не позволяют полностью исключить возникновение мутаций в тех областях бактериального генома, изучение которых оказалось невозможным.

В то же время, большинство тестовых штаммов, получаемых из коллекций, используется для подтверждения достоверности проведенных культурально-морфологических и биохимических исследований в области микробиологии. Поэтому разработка эффективных методов подтверждения биохимических характеристик штаммов, выдаваемых из коллекций микроорганизмов, представляет актуальную научную задачу.

Другой проблемой является возможное накопление ошибок, вызванных человеческим фактором, при постоянных пересевах. В первую очередь к ним относятся непреднамеренная подмена образцов и возможное загрязнение микробных культур посторонней микрофлорой. Несмотря на высокую эффективность технологий массивного параллельного секвенирования, данный метод остаётся достаточно затратным, особенно в случае необходимости проведения анализа единичных образцов. Поэтому проведение исследований по определению эффективности современных биохимических методов подтверждения аутентичных свойств штаммов является актуальной научной задачей.

Преимущество автоматических биохимических анализаторов типа VITEK для проведения подобных исследований обусловлено наличием высокоэффективной системы интерпретации экспериментальных данных. В зависимости от полученных результатов, автоматические системы могут определить надёжность проведения биохимической идентификаций микроорганизмов, что значительно увеличивает достоверность проводимых исследований.

В диссертационной работе Червяковой Надежды Сергеевны проведено комплексное изучение эффективности автоматических систем биохимической и физико-химической идентификации микроорганизмов и обработки данных, для оптимизации их использования в коллекционной деятельности.

Целью данного исследования является совершенствование методических подходов к установлению аутентичности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и оптимизация способов их долгосрочного хранения.

Задачи исследования сформулированы четко, полностью отражают структуру диссертационного исследования и достаточны для достижения поставленной цели.

Степень обоснованности научных положений диссертации обеспечена глубоким анализом литературы, насчитывающим 251 источник, методически правильным соотношением целей, задач исследования и путей их реализации, достаточным количеством проведенных экспериментов, арсеналом эффективных методов исследований.

Доказуемость результатов работы основывается на значительном массиве экспериментальных, статистически обработанных данных, их согласованностью с выдвинутыми теоретическими положениями автора, а также выполнением исследований на сертифицированном и метрологически поверенном оборудовании. Выводы работы теоретически и экспериментально обоснованы, отражают цель, задачи диссертации и выносимые на защиту положения.

Новизна исследования полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Новизна исследования и полученных автором результатов заключается в том, что впервые по сочетанию биохимической активности (от 40 до 60 признаков), молекулярно-генетическому профилированию (структуре и расположению *rnp*-оперона) и спектрам рибосомальных белков проведена расширенная идентификация 130 штаммов микроорганизмов I-IV групп патогенности из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», использующихся в качестве контрольных в диагностической и производственной деятельности.

В работе Надежды Сергеевны проведено теоретическое обоснование эффективности предложенных схем долгосрочной консервации путем расчёта прогнозируемых сроков хранения лиофилизированных и замороженных препаратов контрольных штаммов в зависимости от видовой принадлежности патогена, типа лиофильной установки и состава крио- и лиопротекторов.

Показано, что адаптированный метод низкотемпературного замораживания позволяет значительно увеличить сроки хранения контрольных штаммов в рабочих коллекциях в условиях минус 70°C с применением в качестве криопротекторов протеозопептона с 50 % глицерином, сухого молока с добавлением трегалозы, СЖА.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации

Теоретическая значимость представленной диссертации состоит в получении знаний, формирующих представления о современных подходах к установлению аутентичности штаммов патогенных микроорганизмов на базе полифазного подхода, основанного на изучении биохимической активности в отношении 5 – 13 биохимических субстратов, ферментируемых клетками микроорганизма, изучении 1 – 9 фрагментов *rnp*-оперона с молекулярными массами в интервале 0,99 – 14,38 т.п.н., а также определении 1 – 15 рибосомальных белков с массой 3,06 – 9,78 кДа. По результатам работы сформирована единая база данных, позволяющая осуществлять контроль их подлинности на всех этапах воспроизводства.

Полученные в ходе работы данные вошли в раздел методических рекомендаций: МР 4.2.0089-14 «Использование метода впемяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности» и МР 4.2.0090-14 «Использование методов полиморфизма длин рестриционных 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, соответственно. Одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 4 от 9 июня 2015 г.) и утверждены директором института В.В. Кутыревым «Методические рекомендации по установлению аутентичности и систематического положения коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов».

На основе полученных результатов впервые создан каталог аналитических данных, направленный на установление аутентичности контрольных штаммов, использующихся при проведении диагностических исследований для контроля качества медицинских диагностических и профилактических препаратов, а также пищевых продуктов. Составлены «Методические рекомендации по созданию структуры и заполнению базы данных коллекционных штаммов микроорганизмов на основе программного пакета Bionumerics», которые одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 2 от 28.04.2016 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Основные научные положения диссертационной работы, выводы, заключения, сформулированные автором, вполне логичны, теоретически обоснованы и базируются на полученных в ходе исследования данных. Работа выполнена на современном методическом уровне, достоверность представленных результатов не вызывает сомнений, экспериментальные исследования проведены в достаточной повторности, материал подвергнут статистической обработке. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли принципиальное отражение в выводах, вытекающих из существа проделанной работы, и соответствуют поставленным целям и задачам.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертация написана в классическом стиле, изложена на 177 страницах, состоит из введения, главы обзора литературы, пяти глав собственных исследований (в том числе одной главы с описанием материалов и методов), заключения, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы и выводов, иллюстрирована 29 таблицами и 28 рисунками. Библиография содержит ссылки на 251 публикаций (88 отечественных и 163 зарубежных).

Материалы диссертации представлены на X Съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и

перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», (Москва, 12-13 апреля, 2012 г.); на XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (Саратов, 16-17 октября, 2012 г.); на юбилейной научно-практической конференции Уральской противочумной станции 1914-2014 гг. (Уральск, 2014 г.); на VII ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 30 марта – 1 апреля 2015 г.); на итоговых научных конференциях РосНИПЧИ «Микроб «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в институте «Микроб» (Саратов, 2-4 мая 2012, 2014 – 2017 г.).

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

В главе 1 «Обзор литературы» изложены данные об эволюции принципов классификации, идентификации и установления аутентичности бактерий, современных способах консервации бактерий в коллекционных центрах и использовании коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов в научно-исследовательской деятельности и практике здравоохранения. Основное внимание уделяется вопросам описания, идентификации и систематизации микроорганизмов, технологиям поддержания штаммов микроорганизмов в жизнеспособном состоянии, а также конструированию панелей тестовых штаммов для осуществления контроля при проведении микробиологических исследований.

В главе 2 «Материалы и методы» приводятся описания 130 штаммов бактерий, взятых для исследований, использованных химических реагентов, методов изучения и идентификации микроорганизмов. Приводится описание технологий лиофилизации и криоконсервации микроорганизмов, использованных в работе.

Глава 3 «Определение аутентичности и таксономической принадлежности коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов» посвящена описаниям результатов исследований. Проведенный анализ 28 штаммов бактерий рода *Bacillus* с применением сред Гисса показал недостаточную разрешающую способность этого набора, не позволив полностью идентифицировать их до вида. В главе 3 приводятся данные по идентификации штаммов патогенных микроорганизмов с использованием API® системы (Bio-Mérieux, Франция), серологические свойства бактерий рода *Shigella* и *Salmonella*. В разделе «Поиск маркеров аутентичности коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов, ассоциированных с их биохимической активностью» описываются результаты биохимических исследований и их обработка в пакете BioNumerics v. 7.5. Кроме этого, в главе 3 приводятся описание экспериментов по идентификация тест-

штаммов патогенных микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии и риботипирование на автоматической станции Dupont Qualicon RiboPrinter®System.

Глава 4 «Разработка алгоритма установления аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов и создание базы данных для его выполнения» работы посвящена систематизации данных, полученных ранее с помощью фенотипического анализа на автоматическом бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact, методов рибопринтинга и масс-спектрометрии в пределах одной базы данных, а также формирование на их основе единого алгоритма установления аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов.

В первой части главы 5 «Разработка схемы процесса консервации коллекционных штаммов патогенных бактерий» приводится описание технологий консервации микроорганизмов с использованием лиофильного высушивания, режимов работы установок и составов защитных сред, использованных при проведении исследований. В главе приводятся данные о сохранении жизнеспособности микробных клеток изученных видов бактерий при использовании различных сред высушивания, а также расчётные сроки хранения разных типов образцов. Во второй части главы 5 приводится описание экспериментов по низкотемпературной консервации референтных штаммов при температуре минус 70 °С в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Показано, что устойчивость штаммов к действию низких температур различная. Так, выживаемость *Citrobacter*, *Proteus*, *Plesiomonas*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Shigella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* к концу срока хранения в 10 % водном растворе глицерина составляет 32 – 63 %. Использование 2 % протеозопептона с 50 % глицерина, сред 2 и 3, СЖА позволило увеличить процент выживаемости клеток до 70 %, до 65 %, до 69 % и до 68 %, соответственно, за тот же период наблюдения.

Оценивая диссертацию в целом, считаем необходимым отметить, что по актуальности проблемы, содержанию представленных материалов, методическому уровню, научной новизне и практической значимости она может быть расценена как завершённое исследование. Работа изложена убедительно, хорошо иллюстрирована, личный вклад соискателя в выполнении экспериментов и обобщении результатов исследований несомненен.

Существенных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы Червяковой Надежды Сергеевны нет. Однако необходимо отметить ряд недочётов. К сожалению, автор не продемонстрировала использование в своей работе отечественных зарегистрированных питательных сред. В разделе материалы и методы указаны питательный агар (Himedia, India), триптиказо-соевый питательный бульон (Merck KGaA, Germany), протеозопептон (Himedia, India). Единственным реактивом российского производства является сыворотка крови крупного рогатого скота для культур клеток, жидкая, стерильная (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург). Считаем необходимым

использовать при проведении подобных работ имеющиеся российские среды и проверять их эффективность по отношению к продукции зарубежных производителей.

В тексте диссертации имеются некоторые неточности. Так, в оглавлении указано, что разделы «Практические рекомендации» и «Дальнейшие перспективы» находятся на странице 133, однако в тексте диссертации они расположены на странице 144. Также в описании структуры диссертации на странице 14 указано, что библиографический указатель содержит 89 отечественных источников, в то время как в списке литературы имеется только 88 русскоязычных работ (стр. 157).

Хочется также обратить внимание, на не слишком удачные обозначения штаммов. Отсутствие информации об инвентарном номере (уникальном номере штамма в коллекции) делает крайне затруднительным сравнение данных, представленных в разных разделах диссертации. В таблице 3 (стр. 59) не понятна система группировки штаммов. Например, штаммы *E. coli* сгруппированы в двух строках в соответствии с профилем штамма. Однако штаммы *S. typhimurium* расположены в четырёх строках, несмотря на то, что они имеют одинаковые профили штамма.

При этом, нужно подчеркнуть, что изложенные замечания не являются принципиальными и не снижают ценность проведенного исследования. Сформулированные выводы соответствуют задачам исследования.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата оформлено в соответствии с требованиями стандарта и полностью соответствует основным положениям диссертации. Его прочтение дает полное представление о проделанной работе.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации автором опубликованы 10 работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах.

Заключение

Диссертационная работа Червяковой Надежды Сергеевны «ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К УСТАНОВЛЕНИЮ АУТЕНТИЧНОСТИ И КОНСЕРВАЦИИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ», является законченным научно-квалификационным исследованием, имеющим теоретическое и большое практическое значение, и полностью соответствует требованиям п. 9 положения ВАК «О порядке присуждения ученых степеней и званий» (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор Червякова Надежда Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании Ученого совета ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» от 28 ноября 2017, протокол № 8.

Богун Александр Геннадьевич

Кандидат биологических наук, заведующий отделом коллекционных культур



Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п.Оболенск.
Тел. 8(4967) 36-00-10; факс 8(4967) 36-00-10 info@obolensk.org
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Подпись Богун А.Г. заверяю
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ПМБ,
доктор биологических наук
Тел.-8(4967)-36-00-69, E-mail: kolombet@obolensk.org



Л.В. Коломбет