

Отзыв

научного руководителя, кандидата биологических наук А. В. Осина
на диссертационную работу Надежды Сергеевны Червяковой «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

Диссертационная работа Надежды Сергеевны Червяковой выполнена в отделе «Государственная коллекция патогенных бактерий» Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 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). Отдельные экспериментальные исследования (п.п 3.3, 3.4 главы 3 диссертационной работы) выполнены на базе отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора совместно с заведующим лаборатории оперативной диагностики, канд. биол. наук С. А. Портенко и науч. сотр. лаборатории молекулярной диагностики, канд. биол. наук А. С. Абдрашитовой.

Актуальность проблемы диссертационного исследования соискателя определяется следствием постоянных изменений и коррекций, вносимых в номенклатуру прокариот, а также требованиями, предъявляемыми к современным подходам их длительного хранения. В связи с этим, существует необходимость в периодическом проведении номенклатурной ревизии коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, использующихся в качестве референтных для обеспечения контроля различных научно-практических исследований, с целью уточнения их систематического положения на основании обновляющихся (или вновь вводимых) признаков, характеризующих видовую принадлежность микроорганизма, с применением современного набора методов установления их аутентичности, основанных на использовании автоматизированных систем биохимического и молекулярно-генетического анализа. Кроме того, необходимо совершенствование подходов по поддержанию штаммов в

жизнеспособном состоянии с сохранением первоначальных свойств в течение максимально возможного времени. Одним из оптимальных методов хранения является лиофилизация, обеспечивающая наибольшую стабильность признаков в течение длительного времени (30 лет и более) и позволяющая не только поддерживать штаммы коллекционного фонда, но и обеспечивать их образцами сторонние учреждения, осуществляя пересылку без сохранения холодной цепи. Используемое ранее для этих целей оборудование к настоящему времени требует замены на современные сублимационные установки. При этом внедрение новых лиофильных аппаратов для высушивания патогенных микроорганизмов влечет за собой необходимость отработки условий этого процесса с учетом их технических характеристик, конструктивных особенностей и обеспечения режима биологической безопасности. Другим более простым и удобным методом консервации часто востребованных штаммов, прежде всего в рабочих коллекциях, не требующих транспортировки на дальние расстояния, является низкотемпературное замораживание при температуре минус 70 °С. Основной сложностью в реализации такого типа хранения представляет подбор условий, поскольку универсальных способов консервации не существует. В связи с этим, очевидна актуальность исследований, направленных на оптимизацию существующих подходов долгосрочного хранения с подбором условий и адаптации нового оборудования к консервации патогенных микроорганизмов с целью сохранения жизнеспособности и увеличению сроков хранения их коллекционных штаммов, в том числе и референтных, а также повышения эффективности этого процесса и уменьшению времени его выполнения.

Для осуществления поставленной цели диссертантом проведен комплексный анализ 130 штаммов патогенных микроорганизмов из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», принадлежащих к 23 родам и 57 видам, использующихся в качестве контрольных в диагностической и производственной деятельности, с применением автоматизированных систем биохимического и молекулярно-генетического анализа. В результате исследования были получены «молекулярные портреты» контрольных штаммов, позволяющих комплексно проводить их родовую, видовую и подвиговую дифференциацию. Сведение результатов фенотипических, молекулярно-генетических и протеомных исследований в единой базе данных, позволило определить комплекс маркеров аутентичности для каждого из исследуемых референтных штаммов. Данное исследование позволило впервые комплексно охарактеризовать панель контрольных

штаммов, поддерживаемых в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», и способствовало обеспечению их подлинности, на всех этапах воспроизводства. По материалам проведенных исследований разработан 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.

На модели 60 штаммов, относящихся к 22 родам и 40 видам, научно обоснованы схемы долгосрочной консервации референтных штаммов патогенных микроорганизмов методами лиофилизации на современных сублимационных установках камерного, коллекторного типов и низкотемпературного замораживания, обеспечивающие длительное поддержание образцов в жизнеспособном состоянии при обеспечении биологической безопасности всего технологического процесса. Дана оценка использования различных лио- и криопротекторов на качество получаемых препаратов коллекционных штаммов. Эффективность предложенных схем долгосрочной консервации теоретически обоснованы путем расчёта прогнозируемых сроков хранения лиофилизированных и замороженных препаратов контрольных штаммов.

Полученные в ходе работы данные вошли в раздел методических рекомендаций: МР 4.2.0089-14 «Использование метода втемяпролетной 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 референтных 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.

Для выполнения лиофильного высушивания референтных штаммов патогенных микроорганизмов на современных сублимационных установках камерного и коллекторного типа разработаны методические рекомендации: «Ллиофильное высушивание неспорообразующих возбудителей инфекционных заболеваний III-IV групп патогенности на лиофилизаторе *Martin Christ*», одобрены Ученым советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 23 декабря 2010 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым; «Ллиофильное высушивание коллекционных штаммов бактерий III-IV групп патогенности на коллекторных лиофилизаторах с холодным конденсором» одобрены Ученым советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 26 декабря 2012 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым.

С целью стандартизации процедуры низкотемпературной консервации возбудителей I-IV групп патогенности при температуре минус 70 °С, составлены «Методические рекомендации по низкотемпературной консервации возбудителей I-IV групп патогенности при температуре минус 70 °С», которые одобрены Ученым советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 2 от 20 апреля 2012 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым.

Отличительной чертой этой диссертационной работы является высокий методический уровень проведения исследований, использование современных автоматизированных систем биохимического и молекулярно-генетического анализа (*VITEK 2 Compact, Dupont Qualicon RiboPrinter[®] System, MicroFlexTM LT MALDI-TOF*).

Результаты работы представлены в ряде российских и зарубежных конференций. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 4 - в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК.

Актуальность диссертационной работы, ее научная новизна, теоретическая и практическая значимость не вызывают сомнения. Значение полученных соискателем

результатов исследования для практики подтверждается тем, что они вошли в содержание двух методических рекомендаций федерального уровня внедрения, пяти – учрежденческого. На основе полученных результатов, подготовлены паспорта референтных штаммов, создана база данных патогенных микроорганизмов, включающая сведения о ферментативной активности, протеомном профиле рибосомальных белков и структуре *rnp*-оперона. Разработанный алгоритм установления аутентичности и оптимизированные методы долгосрочной консервации внедрены в практику работы отдела «Государственная коллекция патогенных бактерий».

Представленные выводы аргументированы, достоверны и соответствуют поставленным цели и задачам. Положения, выносимые на защиту, отражают результаты проведенных исследований. Диссертанта отличает высокий уровень профессиональной подготовки, целеустремленность, трудоспособность и склонность к проведению научных исследований, быстрое освоение современных методов молекулярной диагностики.

Таким образом, диссертационная работа Червяковой Н. С. является законченным экспериментальным исследованием, которое соответствует критериям «Положений о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Российской Федерации, а ее автор Надежда Сергеевна Червякова заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Научный руководитель,
Заведующий отделом «Государственная
коллекция патогенных бактерий» ФКУЗ
РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора,
канд. биол. наук.



/А. В. Осин/

Подпись А. В. Осина заверяю
Начальник отдела кадров
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора



/ Е.Ф. Шамшурина /

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46.
Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12. E-mail: rusrapi@microbe.ru