

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.078.02,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО КАЗЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК**

аттестационное дело N _____
решение диссертационного совета от 21 декабря 2017 г. N 21

**О присуждении Червяковой Надежде Сергеевне, гражданке России, ученой
степени кандидата биологических наук.**

Диссертация «Оптимизация подходов к установлению аутентичности и
консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов»

по специальности 03.02.03 – микробиология, принята к защите 16 октября 2017 г.,
протокол N 18 диссертационным советом Д 208.078.02, созданном на базе
Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-
исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, г.
Саратов, ул. Университетская, 46. Создан Приказом Минобрнауки России № 903/нк
от 6 августа 2015 г.

Соискатель Червякова Надежда Сергеевна 1978 года рождения,

В 2000 году соискатель окончила Саратовский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, работает научным сотрудником в Федеральном казенном
учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека..

Диссертация 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.

Научный руководитель - кандидат биологических наук, Осин Александр
Владимирович, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский
научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел

«Государственная коллекция патогенных бактерий», заведующий отделом.

Официальные оппоненты: **Щербаков Анатолий Анисимович**, доктор биологических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, кафедра микробиологии, биотехнологии и химии, профессор кафедры; **Саяпина Лидия Васильевна**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, «Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, управление экспертизы противобактериальных МИБП, главный эксперт, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, пос. Оболенск, в своем положительном заключении, подписанном Богун Александром Геннадьевичем, кандидатом биологических наук, отдел коллекционных культур, заведующий отделом, указала, 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 работы нет. Есть недочеты. Автор не продемонстрировала использование в своей работе отечественных зарегистрированных питательных сред. Единственным реактивом российского производства является сыворотка крови крупного рогатого скота для культур клеток, жидкая, стерильная. В тексте диссертации имеются некоторые неточности. Не слишком удачно обозначены штаммы. Отсутствие информации об инвентарном номере делает крайне затруднительным сравнение данных, представленных в разных разделах диссертации. В таблице 3 не понятна система группировки штаммов. Заключение: диссертационная работа Червяковой Н.С. является законченным научно-квалификационным исследованием, имеющим теоретическое и практическое значение, и полностью соответствует п.9 «Положения о присуждении ученых

степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г, № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор Червякова Н.С. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 10 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 4 работы. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах отсутствуют.

Авторский вклад составляет 60%, объем научных изданий 4,0 п.л.

1. Червякова, Н. С. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов [Текст] / Н. С. Червякова, Т. В. Валова, А. В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – Вып. 3. – С. 65 – 68 (**журнал из перечня ВАК**).
2. Осин, А. В. Применение автоматизированных систем идентификации микроорганизмов для верификации таксономической принадлежности коллекционных штаммов патогенных бактерий [Текст] / А. В. Осин, Н. С. Червякова, С. А. Портенко, А. С. Абдрашитова, В. Е. Куклев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 1. – С. 79 – 83 (**журнал из перечня ВАК**).
3. Осин, А. В. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов [Текст] / А. В. Осин, Н. С. Червякова, Т. В. Валова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 66 – 70 (**журнал из перечня ВАК**).
4. Червякова, Н. С. Установление аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов с применением автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 [Текст] / Н. С. Червякова, А. В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – Вып. 1. – С. 100 – 104 (**журнал из перечня ВАК**).

На автореферат поступили отзывы: 1. Жилченко Елена Борисовна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией « Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Положительный, без замечаний. 2. Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, врио зам. директора по научной работе, заведующая музеем живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Положительный, без замечаний. 3. Молчанова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ «Волгоградский научно-

исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Положительный, без замечаний. 4. Мека-Меченко Татьяна Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии и эпидемиологии чумы Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева. Положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты и специалисты ведущей организации являются ведущими учеными в области микробиологии возбудителей опасных инфекционных болезней, распространенных на территории Российской Федерации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан алгоритм определения аутентичности и систематической принадлежности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, включающий скрининг культурально-морфологических свойств штаммов, определение их ферментативной активности по отношению к широкому спектру дифференцирующих субстратов, установление профиля рибосомальных белков и определение риботипа; заключительную обработку результатов тестировали в биоинформационном программном пакете BioNumerics.

Доказана перспективность использования предложенного алгоритма. Разработанный подход позволил провести номенклатурную ревизию референтных штаммов из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», оценив их соответствие паспортным данным и таксономическую принадлежность с точки зрения современной систематики прокариот. Алгоритм определения аутентичности и систематической принадлежности коллекционных штаммов используется также при включении новых штаммов в коллекционный фонд и осуществлении контроля их подлинности на этапах воспроизводства.

Показано, что разработанные схемы долгосрочной консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов методами лиофилизации и низкотемпературной консервации обеспечивают длительное сохранение их образцов в жизнеспособном состоянии и отвечают всем требованиям биологической безопасности. Предложенные схемы лиофилизации в совокупности с выбором лиопротектора позволили на основании полученных с их применением данных о

выживаемости и жизнеспособности 45 контрольных штаммов подтвердить высокую эффективность используемых лиофильных установок при выбранных параметрах.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что изложены положения, расширяющие представления о подходах к установлению аутентичности штаммов патогенных микроорганизмов и их долгосрочной консервации. Доказана информативность комплекса маркеров аутентичности, включающего биохимическую активность штамма по отношению к дифференциально-диагностическим субстратам, структуру и расположение *rnp*-оперона и профиль рибосомальных белков - для родовой, видовой и подвидовой дифференциации штаммов, контроля их подлинности в процессе хранения и воспроизводства. Применительно к проблематике диссертации результативно использован набор микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования. С применением разработанного алгоритма определения аутентичности и систематической принадлежности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов проведена расширенная идентификация 130 штаммов микроорганизмов I-IV групп патогенности, поддерживаемых в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и использующихся в качестве контрольных в диагностической и научно-практической деятельности. Штаммы оценены по биохимической активности (40 – 60 признаков), молекулярно-генетическому профилю и спектрам рибосомальных белков. 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. Осуществлен выбор оптимальных лиопротекторов. Показано преимущество для лиофилизации бактериальных штаммов сухого молока с добавлением трегалозы, сахарозо-желатиновой и лактозо-желатиновой сред. Установлено, что адаптированный метод низкотемпературной консервации с применением в качестве криопротекторов сахарозо-желатинового агара, протеозопептона с 50% глицерином, а также сухого молока с добавлением трегалозы в значительной мере увеличивает сроки хранения и поддержания коллекционных штаммов в жизнеспособном состоянии при обеспечении биологической безопасности всего технологического процесса. Проведено теоретическое обоснование

эффективности предлагаемых адаптированных методов долгосрочной консервации коллекционных штаммов на основе прогнозируемых расчетов сроков их хранения, находящихся в интервале от 2 до 100 лет в зависимости от видовой принадлежности патогена, типа лиофильной установки и состава крио- и лиопротекторов

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что они вошли в состав двух разработанных и внедренных в практику методических рекомендаций федерального уровня: 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» и 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, соответственно.

Создан комплекс методических рекомендаций учрежденческого уровня, направленных на обеспечение установления аутентичности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и адаптацию подходов к долгосрочной консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов методами лиофилизации и низкотемпературной консервации: «Методические рекомендации по установлению аутентичности и систематического положения коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов» (одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» протокол № 4 от 9 июня 2015 г.); «Методические рекомендации по созданию структуры и заполнению базы данных коллекционных штаммов микроорганизмов на основе программного пакета Bionumerics», (одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» протокол № 2 от 28.04.2016 г.); «Леофильное 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.); «Леофильное высушивание коллекционных штаммов бактерий III-IV групп патогенности на коллекторных лиофилизаторах с холодным конденсатором» одобрены Ученым советом

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 26 декабря 2012 г.); «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.).

Получены данные, свидетельствующие о высокой эффективности установок коллекторного типа для поддержания коллекционного фонда штаммов патогенных микроорганизмов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что все проведенные эксперименты выполнялись на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании: фенотипический и биохимический анализ осуществлялся с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (Франция) и микрообъемной тест-системы API (Франция); молекулярно-генетический анализ - автоматической станции RiboPrinter System (США); протеомные исследования - масс-спектрометра Microflex Maldi Biotyper (США); долгосрочная консервация коллекционных штаммов - сублимационных установок камерного и коллекторного типа. Комплексный анализ результатов исследования проводили с помощью программного биоинформационного пакета BioNumerix 8.0 (Бельгия), в работе использовали методы вариационной статистики. Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, логики экспериментальных разделов и выводов. В диссертации использовано сравнение авторских данных и разработок с полученными ранее данными и мировыми аналогами.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном выполнении всех основных разделов диссертационного исследования, интерпретации и систематизации полученных данных, их апробации на международных, всероссийских конференциях и ежегодных научно-практических конференциях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», подготовке основных публикаций по материалам диссертации.

Диссертация Червяковой Н.С. по основному содержанию отвечает требованиям пунктов 9, 13,14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ 24.09.2013 г. № 842 с дополнениями, содержащимися в Постановлении Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335.

На заседании 21 декабря 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Червяковой Н.С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 5 докторов наук по специальности 03.02.03 – биологические науки и 6 докторов наук по специальности 03.02.03 – медицинские науки, участвовавших в заседании, из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 21, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



Кутырев Владимир Викторович

Слудский Александр Аркадьевич

22 декабря 2017 г.