

Отзыв

**официального оппонента о научно-практической ценности
диссертационной работы Сазановой Елены Владимировны
«Моделирование диагностически значимых свойств *Yersinia pestis* с
использованием авирулентных штаммов», представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – Микробиология**

Актуальность темы диссертации

Существование природных очагов чумы на территориях Российской Федерации, стран ближнего и дальнего зарубежья, регистрация периодического роста их эпизоотической активности и спорадических случаев заболевания людей, диктуют необходимость систематического эпидемиологического надзора. Неотъемлемой частью надзорных мероприятий является лабораторная диагностика, осуществляемая в учреждениях Роспотребнадзора специально подготовленным персоналом, прошедшим профессиональную переподготовку с освоением методов безопасной работы.

Совершенствование образовательных технологий подготовки специалистов, только начинающих приобретать навыки безопасного выполнения манипуляций с возбудителями особо опасных инфекций, для снижения вероятности их лабораторного инфицирования является актуальным направлением научных исследований. Соответственно актуальна и цель рецензируемого исследования, заключающаяся в характеристике основных биологических свойств штаммов *Yersinia pestis* для формирования учебного набора, позволяющего моделировать диагностические признаки и снизить вероятность инфицирования специалистов при освоении методов лабораторной диагностики чумы. Перспективным подходом является использование учебных авирулентных штаммов возбудителя чумы.

На момент начала исследования отсутствовало понятие «учебный штамм *Y. pestis*», не было четких критериев и конкретных рекомендаций для отбора и применения штаммов чумного микроба для моделирования на практических занятиях диагностически значимых свойств, не проводилось целенаправленных исследований по разработке репрезентативной выборки штаммов, характеризующих весь комплекс диагностических свойств чумного микроба и позволяющих снизить вероятность инфицирования специалистов при освоении методов лабораторной диагностики чумы. В связи с этим, несомненно актуальность темы и цели диссертационной работы Сазановой Е.В.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования

Сазановой Е.В. сформулировано понятие «учебный штамм *Y. pestis*» и разработаны критерии отбора штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y.*

enterocolitica и *P. multocida* для использования на курсах дополнительного профессионального образования при освоении лабораторной диагностики чумы.

Получены характеристики штаммов *Y. pestis*, перспективных в качестве учебных, по диагностически значимым свойствам: кальцийзависимость, пигментсорбция, чувствительность или резистентность к диагностическим чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам, продукция пестицина и чувствительность к нему, чувствительность к ряду антибиотиков, показатель LD₅₀; определены их молекулярно-генетические особенности.

Сазановой Е.В. предложены подходы для воспроизведения чумы у лабораторных животных с помощью авирулентных штаммов: выбор штаммов *Y. pestis* трех биоваров и заражающей дозы; способа заражения; подбор железосодержащего морбитора и его соотношения с микробной взвесью; показано формирование выраженных патологоанатомических изменений в организме аутбредных белых мышей и сокращение в 2 раза (до 24 ч) срока созревания типичных колоний *Y. pestis* при посеве лимфоузлов и паренхиматозных органов лабораторных животных на плотной питательной среде, и, следовательно, ускорение накопления и идентификации выделенной бактериальной культуры. Подтверждено отсутствие повышения вирулентности используемых штаммов после комбинирования с сульфатом железа.

Сазановой Е.В. для оценки *in vitro* патогенных свойств штаммов *Y. pestis* – кандидатов в учебные применен тест на цитотоксичность в отношении лейкоцитов цельной крови человека и определены пороговые значения для характеристики штамма как вирулентного (гибель более 80 % лейкоцитов в исследуемом образце цельной крови через 48 ч при температуре 37 °С) и авирулентного (менее 50 % лейкоцитов). Установлена высокая степень корреляции показателей цитотоксичности и значений LD₅₀ для белых мышей, что обосновывает целесообразность дополнения комплексной характеристики патогенности штаммов чумного микроба количественным показателем, имеющим непосредственное отношение к организму человека.

На основании результатов проведенного комплексного анализа биологических свойств сформирован учебный набор, включающий 10 штаммов *Y. pestis*; 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*; 1 штамм *Y. enterocolitica*; 1 штамм *Pasteurella multocida*. Разработан дифференцированный подход к применению штаммов учебного набора в соответствии с их фено- и генотипическими особенностями для моделирования диагностически значимых признаков при освоении микробиологии и лабораторной диагностики чумы и в соответствии с их LD₅₀ для снижения вероятности инфицирования.

В Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» депонированы 8 штаммов *Y. pestis*, 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм *Y. enterocolitica* и 1 штамм *P. multocida*, включенные в учебный набор.

Полученные данные о фенотипических, молекулярно-генетических свойствах и LD₅₀ исследованных коллекционных штаммов внесены в паспорта. По материалам исследований получен патент на изобретение № 2642322 «Набор штаммов бактерий, используемый для обучения вопросам микробиологии и методам лабораторной диагностики чумы».

В ходе апробации (2017 и 2018 гг.) подтверждена результативность применения разработанного учебного набора при подготовке специалистов (акт внедрения, утвержденный директором института). Практическая значимость работы очевидна и подтверждается включением материалов исследований в 6 методических рекомендаций, утвержденных на учрежденческом уровне, использованием данных при профессиональной подготовке специалистов на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», других организаций Роспотребнадзора, Минздрава, стран СНГ, а также включением в электронное учебно-методическое пособие «Микробиология, эпидемиология и лабораторный диагноз чумы», разработанное в рамках распоряжения Правительства Российской Федерации №1965-р от 07.10.2014 по поддержке внедрения и реализации положений ММСП в государствах-участниках СНГ и размещенное на сайте ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (school.microbe.ru).

Созданный Сазановой Е.В. набор учебных штаммов позволит моделировать в полном объеме диагностические признаки *Y. pestis* для освоения лабораторной диагностики чумы и обеспечить снижение вероятности лабораторного инфицирования.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

При выполнении экспериментальной работы Сазанова Е.В. использовала бактериологический, биохимические, биологический, иммунологические, молекулярно-генетические методы исследования, анализ аварийности, выбор которых полностью соответствовал цели и задачам. Степень достоверности результатов исследования основывается на использовании большого фактического материала, полученного в повторяющихся экспериментах и статистически обработанного. Достоверность результатов исследования подтверждается табличными и графическими данными, грамотной интерпретацией и, поэтому, не вызывает сомнений. Новизна достигнутых результатов и выводов не противоречит основным сведениям, полученным ранее другими авторами.

Диссертационная работа Е.В. Сазановой представляет собой завершённое исследование, выполненное на современном научно-методическом уровне. Обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций подтверждаются корректно проанализированными объективными экспериментальными данными.

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

Работа Сазановой Е.В. представляет собой законченное научное исследование, которое отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертация изложена на 171 странице, содержит введение, обзор литературы, главу с описанием используемых материалов и методов исследования, 4 главы собственных исследований, заключение, выводы. Список литературы включает 277 источников (201 отечественный и 76 иностранных). Текст иллюстрирован 22 таблицами и 7 рисунками.

Во введении автором обоснованы актуальность исследования, сформулированы цель, пять задач исследования, приведена информация о научной новизне, теоретической и практической значимости работы, степени достоверности и апробации полученных результатов. Три положения, выносимые на защиту, отражают результаты работы, их научная весомость соответствует кандидатскому рангу и не вызывают возражений ни по сути, ни по форме изложения. Описана структура диссертации, дана информация о публикациях.

В главе «Обзор литературы» представлен подробный анализ особенностей освоения лабораторной диагностики чумы на курсах дополнительного профессионального образования: действующая на территории России нормативно-методическая документация с описанием обязательных методов лабораторной диагностики чумы и диагностически значимых свойств *Y. pestis*; опыт использования штаммов *Y. pestis* и обеспечения биологической безопасности при подготовке специалистов на курсах дополнительного профессионального образования. Обзор основан на использовании большого объема научных данных, изложенных логично и грамотно. В целом, содержание «Обзора литературы» свидетельствует не только об актуальности темы исследования, но и позволило автору выявить наиболее уязвимые места и определить приоритетные направления и задачи исследования.

Глава 2 «Материалы и методы» свидетельствует о том, что автором применен широкий спектр методов: микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические, иммунологические, биологический и статистические методы, анализ аварийности. Работа проведена с применением аттестованного оборудования, зарегистрированных препаратов и тест-систем, применяемых для лабораторной диагностики чумы.

Исследования выполнены на 40 штаммах микроорганизмов, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»: из них 27 штаммов *Y. pestis*, 3 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм *P. multocida*; 1 штамм *Y. enterocolitica*; а также штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus epidermidis*, *Bacillus anthracis* СТИ-1,

Shigella sonnei, *Escherichia coli communis*, *E. coli* O 151.

В результате проведенной работы Елена Владимировна, решая, в соответствии с поставленной целью диссертационные задачи, получила оригинальные данные, отвечающие требованиям научной новизны и практической значимости. Результаты собственных исследований изложены в главах 3 – 5.

В связи с тем, что приоритетным направлением совершенствования методической базы подготовки бактериологов является снижение вероятности лабораторного инфицирования обучающихся, в начале главы 3 автором представлены результаты ретроспективного (1972-2009 гг.) анализа аварийности и ее причин при работе слушателей курсов с патогенными микроорганизмами. Полученные данные подтвердили актуальность поиска учебных авирулентных штаммов *Y. pestis* для замены вирулентных и высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708), используемого при освоении ряда диагностически значимых свойств и биологического метода исследования.

В связи с отсутствием понятия «учебный» штамм и его критериев автором были предложены соответствующие термины и их определения. На основании формирования и детального анализа ключевых результатов подготовки специалистов, осуществляющих лабораторную диагностику чумы, сформулированных направлений использования штаммов при освоении методов лабораторной диагностики чумы, а также правил обеспечения биобезопасности разработаны критерии подбора штаммов *Y. pestis* в качестве учебных. Автором обоснована необходимость использования штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida* с целью дифференцирования с *Y. pestis* и разработаны критерии выбора в качестве учебных.

В ходе проведенных исследований получены характеристики 21 коллекционного штамма *Y. pestis* по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным свойствам и сопоставлены с данными *Y. pestis* 231 (708) С. Для углубленной характеристики получены дополнительные сведения об LD₅₀ для белых мышей (100% штаммов); о кальцийзависимости (71%); способности к пигментсорбции (62%); чувствительности к диагностическим чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам (52 %); продукции пестицина и чувствительности к нему (71 %); молекулярно-генетических характеристиках (62%); чувствительности к антибактериальным препаратам (86 %). В результате работы выявлены 9 штаммов *Y. pestis*, перспективных в качестве учебных по фенотипическим свойствам, относящиеся к одному из генетических вариантов: *pgm⁻ (hmsH⁺, irp2⁺) pCad⁺ (lcrV⁺)*, *pgm⁺ (hmsH⁺, irp2⁺) pCad⁻ (lcrV⁻)* или *pCad⁻ (lcrV⁻) pgm⁻ (hmsH⁻, irp2⁻; hmsH⁺, irp2⁺)*, продемонстрировавшие авирулентность по показателю LD₅₀ в отношении белых мышей.

Особого внимания заслуживают данные о цитотоксическом воздействии штаммов *Y. pestis* на лейкоциты цельной крови человека. На основании

полученных результатов сделано предположение о пороговом значении для отнесения штамма к вирулентным (наличие более 80 % погибших клеток в исследуемом образце крови в условиях инкубации 48 ч при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$) и к авирулентным (менее 50 % лейкоцитов). Особенность предлагаемого подхода заключается в моделировании *in vitro* условий организма человека. Установлена высокая степень корреляции показателей цитотоксичности исследованных штаммов *Y. pestis* и их LD_{50} (авирулентные штаммы – $r_s=0,9$; вирулентные – $r_s=0,7$), что свидетельствует о целесообразности дополнения данным методом регламентированного комплекса оценки патогенности.

В этой же главе Сазанова Е.В. приводит результаты анализа фенотипических характеристик штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida*, подобранных выбранных на основе разработанных критериев к учебным штаммам и задач обучения.

В итоге поэтапного комплексного анализа фенотипических, молекулярно-генетических характеристик и вирулентности сформирован набор штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida* для обучения лабораторной диагностике чумы.

В главе 4 представлены результаты экспериментов, направленных на решение задачи по подбору авирулентных штаммы *Y. pestis* и условий их применения для моделирования патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных. Обобщение результатов оценки вирулентности *in vivo* (с учетом выраженности патоморфологических изменений внутренних органов), характеристики патогенных свойств *in vitro* и генетических маркеров вирулентности позволило определить 4 авирулентных штамма, перспективных для моделирования чумы (*pgm⁻*, *pCad⁺*; LD_{50} более или равно 10^8 КОЕ). Подтверждена их авирулентность для морских свинок. Отсутствием области *pgm* обуславливает сниженную способность к размножению, распространению и формированию комплекса патологических реакций в макроорганизме. Автором были оптимизированы условия для развития острого инфекционного процесса у лабораторных животных: внутрибрюшинное введение штамма *Y. pestis* в дозе $1\cdot 10^8$ КОЕ; комбинация с морбитором в соотношении 1:1; применение в качестве морбитора 1 % раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Обнаружены интересные данные о стабильном сокращении в два раза (до 24 ч) срока формирования при температуре 28°C типичных зрелых колоний *Y. pestis* на плотной питательной среде при посеве паренхиматозных органов лабораторных животных, что позволяло ускорить накопление и идентификацию выделенной бактериальной культуры. Полученные результаты позволили исключить применение высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708), обеспечить освоение обучающимися биологического метода исследования и минимизировать вероятность их лабораторного инфицирования.

В главе 5 приведены данные, использованные при разработке дифференцированного подхода к применению учебного набора для подготовки специалистов. На основании установленных биологических свойств микроорганизмов было определено применение каждого штамма при моделировании типичных свойств чумного микроба для изучения регламентированными методами индикации, идентификации и дифференциальной диагностики, а также выявления ряда фенотипических и генетических особенностей. Основным принципом являлась замена высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708). Сазановой Е.В. детально представлено использование штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida* в рамках 10 учебных тем, а также разработаны стандартные учебные образцы для решения ситуационных бактериологических задач - 5 проб клинического материала, 1 проба из объектов внешней среды, 5 проб носителей и переносчиков чумного микроба.

На основании данных о вирулентности *in vivo* разработан дифференцированный подход к использованию штаммов учебного набора для снижения вероятности инфицирования слушателей курсов.

Итогом работы стало формирование учебного набора штаммов бактерий, позволяющего моделировать диагностически значимые для лабораторной диагностики чумы биологические особенности вида, подвидов, биоваров *Y. pestis* и их отличия от других патогенных для человека иерсиний, пастерелл; определить *in vitro* наличие факторов, ассоциированных с вирулентностью; моделировать патоморфологическую картину чумы для всестороннего освоения методов индикации, идентификации, дифференциации; исключить высоковирулентный штамм *Y. pestis* 231 (708) и максимально ограничить применение вирулентных штаммов; в полном объеме осваивать методы лабораторной диагностики чумы, приобретать навыки выполнения микробиологических методов исследования с *Y. pestis* в соответствии с правилами биобезопасности и снизить вероятность лабораторного инфицирования обучающихся.

В «Заключении» подведены основные итоги работы, приведены обобщающие материалы по главам «Собственных исследований» и обоснованы перспективы практического применения результатов.

Пять выводов диссертации полностью соответствуют цели и задачам диссертационного исследования, основываются на представленном экспериментальном материале, аргументированы, являются логическим завершением проделанной работы и не вызывают сомнений в их достоверности.

Диссертация Е.В Сазановой содержит новые научные результаты и положения и обладает внутренним единством. Рецензируемая работа хорошо оформлена и иллюстрирована. Представленные экспериментальные данные вполне убедительны и критических возражений по существу рецензируемой работы нет.

Положительно оценивая работу в целом и подчёркивая её научную новизну и значимость для практики, хотелось бы получить ответы на следующие вопросы, которые возникли при анализе материалов диссертационной работы:

1. Отмечались ли изменения у культур *Y. pestis* выделенных после заражения лабораторных животных, в присутствии сернокислого железа по пигментсорбции, кальцийзависимости и пестициногенности ?

2. Одной из причин происхождения аварий в отделе подготовки и усовершенствования специалистов (1972-2009г), как установлено соискателем, являлись хрупкие материалы: стеклянная лабораторная посуда и инструменты. Осуществляется ли переход на автоматические пипетки и пластиковые чашки Петри?

3. В какой степени остаются приемы работы с резиновыми баллончиками и пастеровскими пипетками в лабораторной практике слушателей курсов?

Изложенные замечания, разумеется, не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации:

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Сазановой Елены Владимировны «Моделирование диагностически значимых свойств *Yersinia pestis* с использованием авирулентных штаммов» в полной мере отражает цель, задачи и основные положения диссертации. Все результаты экспериментальной работы отражены в автореферате.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертационного исследования опубликованы 9 научных работ в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России для публикации материалов диссертационных исследований. Материалы диссертации представлены на межгосударственных и всероссийских научно-практических конференциях, конгрессе, семинарах.

Заключение

Все изложенное свидетельствует о том, что диссертация Елены Владимировны Сазановой «Моделирование диагностически значимых свойств *Yersinia pestis* с использованием авирулентных штаммов» является законченной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком профессиональном уровне.

Соответствие рецензируемого исследования паспорту специальности 03.02.03 «микробиология» (пунктам 2,3,10) обосновано целью, задачами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами.

В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её разрешению, теоретическому и научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям пп. 9, 10, 11

и 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.16 г., № 650 от 29.05.17 г., № 1024 от 28.08.17 г., предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в области микробиологии, а её автор Елена Владимировна Сазанова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры микробиологии,
биотехнологии и химии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Саратовский государственный
аграрный университет им. Н.И. Вавилова»
(ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ)

 Щербаков Анатолий Анисимович

410005 г. Саратов, ул. Соколова 335, ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, кафедра
«Микробиология, биотехнология и химия», учебный комплекс №3, тел. 8(917)318-
99-44, e-mail: scherbakov.2014@yandex.ru
« 11 » февраля 2019 г.

Подпись д.б.н., профессора
Щербакова А.А. заверяю:
Ученый секретарь ученого совета



Муравлев Анатолий Павлович