

Отзыв
официального оппонента на
диссертационную работу Елены Владимировны Сазановой
«Моделирование диагностически значимых свойств *Yersinia pestis*
с использованием авирулентных штаммов»,
представленную к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертации

Чума - зоонозная природно-очаговая инфекционная болезнь, которая представляет опасность для окружающих и может вызвать чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения, имеющую международное значение. Согласно данным ВОЗ в 2010-2015 гг. в мире зарегистрировано 3248 случаев заболевания чумой, в том числе 584 с летальным исходом. На территории Российской Федерации в 2014-16 гг. зарегистрировано три случая заболевания бубонной формой чумы. В связи с этим необходима специальная подготовка работников по лабораторной диагностике чумы, которую осуществляют учреждения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Вместе с тем, в последние годы одной из важных государственных задач определено исключение или максимальное снижение использования в технологических процессах патогенных микроорганизмов. Данный подход актуален при обучении специалистов для работ с возбудителями особо опасных инфекций, так как слушатели курсов не имеют допуска к работе с ПБА I-II групп и только начинают приобретать навыки безопасного выполнения манипуляций, что сопряжено с вероятностью лабораторного инфицирования

Диссертационная работы Сазановой Е.В. посвящена совершенствованию обучения специалистов (врачей и биологов) вопросам микробиологии и лабораторной диагностики чумы путем использования авирулентных штаммов *Yersinia pestis* для моделирования диагностически значимых свойств и снижения вероятности инфицирования обучающихся. Основной целью исследования Елены Владимировны является характеристика основных биологических свойств штаммов

возбудителя чумы и формирование учебного набора.

В связи с этим, актуальность диссертационного исследования Сазановой Е.В. не вызывает сомнения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

При выполнении экспериментальной части работы диссертантом использованы разнообразные методы исследования: микробиологические, иммунологические, биологический, молекулярно-генетические, статистический выбор которых соответствовал поставленной цели и решаемым задачам. Свойства подобранных штаммов *Y. pestis* охарактеризованы, как в системе *in vitro*, так в системе *in vivo*. Работа проведена на штаммах из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, выделенных от больных людей, носителей чумного микроба, из объектов окружающей среды, а также генно-инженерно-модифицированных.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в работе, достаточно обоснованы и весьма убедительны.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций сформулированных в диссертации.

Изучение фено- и генотипических свойств коллекционных штаммов *Y. pestis* позволило отобрать авирулентные штаммы, способные эффективно моделировать типичные признаки, а также свойства, характерные для отдельных биоваров и подвидов. Автор обсуждает полученные результаты, сопоставляя их с имеющимися литературными данными, представляет оригинальные данные ретроспективного (1972-2009 гг.) анализа аварийности и их причин при работе слушателей курсов с патогенными микроорганизмами. Обосновав актуальность применения учебных штаммов, Сазанова Е.В. предложила термины «учебный штамм микроорганизма» и «учебный штамм *Y. pestis*», сформулировала их определения, разработала критерии отбора и направления применения при

освоении методов лабораторной диагностики чумы. Обоснована необходимость использования штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Pasteurella multocida* с целью дифференцирования с *Y. pestis*, оценена аутентичность свойств штаммов, отобранных в соответствии с разработанными критериями. В результате проведенных исследований, опираясь на сформулированные профессиональные компетенции, которые должны получить специалисты в процессе подготовки, перечень обязательных методов индикации, идентификации и дифференциации в учебный набор включены 9 авирулентных и 1 вирулентный штамм *Y. pestis*, 3 штамма - *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм - *Y. enterocolitica* и 1 штамм *P. multocida*.

Для характеристики патогенности штаммов возбудителя чумы в системе *in vitro* Сазановой Е.В. использована методика оценки цитотоксического воздействия штаммов *Y. pestis* на лейкоциты цельной крови человека. Получены оригинальные данные, позволившие установить пороговые значения для дифференциации вирулентных (гибель более 80% лейкоцитов в исследуемом образце крови в условиях инкубации 48 ч при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$) и авирулентных штаммов (гибель менее 50 % лейкоцитов). Установлена высокая степень корреляции показателей цитотоксичности исследованных штаммов *Y. pestis* и их LD_{50} (авирулентные штаммы - $r_s=0,9$; вирулентные - $r_s=0,7$). Обнаруженная тенденция свидетельствует о целесообразности дополнения данным методом регламентированного комплекса оценки патогенности.

Для моделирования чумной инфекции у лабораторных животных Сазановой Е.В. предложены авирулентные штаммы, лишенные области пигментации (*pgm*⁻), имеющие плазмиду кальцийзависимости pCad^+ и LD_{50} большую или равную 10^8 КОЕ, и условия их применения: заражающая доза - 10^8 КОЕ, комбинирование с морбитором 1 % раствором $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в равных объемах. Оптимизированный способ заражения лабораторных животных позволяет решить следующие задачи: 1) стабильное выделять на плотной питательной среде культуру *Y. pestis* при посеве паренхиматозных органов белых мышей; 2) сократить в два раза (до 24 ч) срок формирования на плотной питательной среде типичных зрелых колоний при температуре $28\pm 1^\circ\text{C}$; 3) ускорить накопление выделенной бактериальной культуры, идентификацию, внутривидовую и межвидовую

дифференциацию; 4) исключить применение ранее использованного высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708).

Диссертантом с учетом современных алгоритмов лабораторной диагностики чумы, профессиональных компетенций специалистов проведен анализ установленных индивидуальных фенотипических и генотипических характеристик штаммов возбудителя чумы, в том числе вирулентности, обозначены направления применения каждого штамма учебного набора для моделирования диагностически значимых свойств. Для моделирования ситуационных бактериологических задач разработаны стандартные учебные образцы имитирующие 5 проб биологического материала от больного человека, 5 проб от носителей чумы, 1 пробу объектов внешней среды. Автором предложен дифференцированный на основании показателя LD₅₀ подход к использованию штаммов обучающимися и преподавателями. В результате проведенных исследований Сазановой Е.В. сформирован учебный набор штаммов бактерий, позволяющий исключить использование на практических занятиях высоковирулентных штаммов; освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики чумы; приобрести навыки выполнения бактериологического исследования с *Y. pestis* в соответствии с правилами биобезопасности и снизить вероятность лабораторного инфицирования обучающихся.

Степень достоверности результатов исследования подтверждается табличными и графическими данными, грамотной интерпретацией. Новизна достигнутых результатов и выводов не противоречит основным сведениям, полученным ранее другими авторами.

Структура диссертации и оценка содержания в целом.

Диссертация изложена на 171 странице, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием используемых материалов и методов исследования, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендации, перспектив дальнейшей разработки темы, перечня сокращений и условных обозначений. Работа иллюстрирована 22 таблицами и 7 рисунками. Список литературы включает 201 работу отечественных и 76 зарубежных авторов.

Положения, выносимые на защиту, аргументированы и подтверждены результатами диссертационного исследования. Выводы логично завершают представленный труд. Материалы работы прошли широкую апробацию на межгосударственных и всероссийских научно-практических конференциях, конгрессе, семинарах. Имеющиеся 9 публикации, изданных в журналах рекомендованных ВАК, и автореферат с достаточной полнотой отражают содержание диссертации.

Положительно оценивая рецензированную работу, не могу не высказать ряд замечаний:

1. Вы пишете «... отобранные штаммы депонированы в ГКПБ РосНИПЧИ «Микроб». Но, Вы эти штаммы и получали из ГКПБ. Речь идет о более полной характеристике этих штаммов.

2. Неудачно сформулирована цель исследования: «характеристика основных биологических свойств штаммов *Y. pestis* позволяет моделировать диагностические признаки ...». Диагностические признаки нельзя так моделировать; они или есть, или их нет.

3. В работе использованы стандартные бактериологические методики и не было необходимости подробно их описывать.

4. Вы пишете, что разработанный дифференцированный подход к использованию штаммов учебного набора позволяет минимизировать вероятность лабораторного заражения. Но для этого достаточно строго соблюдать правила безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности.

5. В критерии для отбора «учебных штаммов» *Y. pestis* я бы не включала п.п. 4, 5, 6 в такой формулировке:

п. 4. «отсутствие или наличие: ферментации рамнозы, арабинозы, мелибиоза, глицерина, денитрифицирующей активности, продукции пестицина и чувствительности к нему, пигментсорбции; кальцийзависимости, фибринолитической и плазмокоагулазной активности»;

п. 5. «чувствительность или резистентность к чумным бактериофагам Л-413С, Покровской и псевдотуберкулезному»;

п. 6. «различные варианты сочетания плазмид pFra и pPst и генов *pla*, *cafI*, *lerV*, *hmsH* и *irp2*». Отсутствие или наличие одновременно признака не может служить критерием для отбора.

6. В таблицах 18 и 19 не указаны особенности инфекционного процесса (или их отсутствие) вызванного разными штаммами.

Хотелось бы услышать разъяснения автора по следующим вопросам:

1. Для выявления капсульного антигена чумного микроба Вы использовали четыре метода. Какой метод наиболее достоверный и может быть рекомендован в работе практических лабораторий?

2. Каков механизм действия использованных в работе морбиторов?

3. Вы считаете, что трехкратный пассаж авирулентных культур *Y. pestis* через организм животных достаточен, чтобы говорить об отсутствии реверсии штаммов в вирулентную форму?

4. В таблице №1 приведены данные о DCL штаммов для животных на момент их выделения, или на момент их использования в работе?

5. Имелись ли особенности инфекционного процесса у животных, вызванного разными штаммами.

Заключение

Диссертационная работа Сазановой Елены Владимировны, выполненная на тему: «Моделирование диагностически значимых свойств *Yersinia pestis* с использованием авирулентных штаммов», является самостоятельным, законченным научным исследованием, в котором представлены результаты изучения гено- и фенотипических свойств *Y. pestis*. Считаю, что по актуальности решенной задачи, научно-методическому уровню выполнения, научной новизне и практической значимости результатов рецензированная работа полностью отвечает требованиям п. 2.3.10 «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 России к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения

ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

профессор кафедры микробиологии
с вирусологией и иммунологией
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Саратовский государственный
медицинский университет имени В. И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук, (научная специальность 03.02.03 – микробиология),
профессор

Швиденко

Швиденко И.Г.

410012 г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112
Тел. (845-2)-27-33-70; (845-2)-66-97-00
e-mail – meduniv@sgmu.ru

Подпись И.Г. Швиденко **ЗАВЕРЯЮ**

Начальник отдела кадров

ФГБОУ ВО

Саратовского ГМУ им. В. И. Разумовского

Минздрава России

Веточкина И.В.

Подпись

«*29* *августа*» 2019

Начальник ОК *И.В.*

