

ОТЗЫВ

научного руководителя по диссертационной работе

Сазановой Елены Владимировны на тему:

«Моделирование диагностически значимых свойств *Yersinia pestis* с использованием авирулентных штаммов», представляемой на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Диссертационная работа Елены Владимировны Сазановой выполнена в отделе образовательных программ и подготовки специалистов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» в соответствии с плановой тематикой НИР.

Актуальность проведенного научного исследования, посвященного созданию набора штаммов бактерий для освоения методов лабораторной диагностики чумы, связана с необходимостью систематического эпидемиологического надзора за 11 природными очагами чумы, существующими на территории Российской Федерации. Одним из основных методов получения информации является лабораторное исследование носителей и переносчиков чумного микроба, больных людей, животных и объектов окружающей среды, что обуславливает необходимость подготовки специалистов противочумных учреждений Роспотребнадзора по вопросам индикации, идентификации чумного микроба и дифференциации от иных патогенных бактерий. Особое внимание к обучению специалистов вызвано возрастанием в последние годы эпизоотической активности природных очагов в зоне Прикаспия и Сибири и регистрацией эпидемиологических осложнений в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Традиционно в процессе подготовки специалистов используют вакцинный и вирулентные штаммы *Y. pestis*. Приоритетность использования авирулентных (со сниженной вирулентностью) штаммов чумного микроба соответствует одному из основных направлений государственной политики в области обеспечения биобезопасности Российской Федерации. Однако применение вирулентных штаммов, в отличие от вакцинного, позволяет изучить свойства всех подвидов, биоваров и освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики. В тоже время их использование повышает вероятность

инфицирования обучающихся, особенно при отсутствии выработанных навыков безопасного выполнения манипуляций с микроорганизмами. Это свидетельствует об актуальности разработки научно обоснованного подхода к совершенствованию методической базы подготовки специалистов по программам дополнительного профессионального образования (ДПО) путем максимального ограничения применения вирулентных штаммов и замены их учебными, преимущественно авирулентными, штаммами возбудителя чумы. До начала исследований, проведенных Е. В. Сазановой, отсутствовали понятие «учебный штамм», «учебный штамм *Y. pestis*» и критерии для их подбора. Впервые разработанные понятия и критерии позволили Е. В. Сазановой для достижения поставленной цели отобрать 21 перспективный штамм *Y. pestis* из «Государственной коллекции патогенных микроорганизмов» на базе института «Микроб». Выбор методических подходов для достижения поставленной цели по созданию учебного набора штаммов патогенных для человека иерсиний и пастерелл был обоснован в процессе анализа литературных и патентных данных в отношении свойств возбудителя чумы, выявляемых с помощью регламентированных в Российской Федерации методов индикации, идентификации, внутривидовой и межвидовой дифференциации, а также современного нормативно-методического обеспечения и исторического опыта подготовки специалистов, осуществляющих лабораторную диагностику чумы.

Для подтверждения наличия риска лабораторного инфицирования Е. В. Сазановой впервые определена апостериорная вероятность аварий при работе слушателей курсов с особо опасными микроорганизмами. Выявлено, что преимущественной причиной зарегистрированных аварий являлся «человеческий фактор». Полученные данные создают основу для совершенствования методического обеспечения подготовки специалистов по освоению свойств *Y. pestis*, базовых для лабораторной диагностики, и методов индикации, идентификации и дифференциации.

Е. В. Сазановой проведен комплексный анализ свойств 21 отобранного коллекционного штамма *Y. pestis* с использованием традиционных культурально-морфологических, биохимических, иммунологических, биологического методов, а также 5 штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *P. multocida*. Специфика выполняемой работы потребовала от диссертанта освоения современных

иммунологических (оценка цитотоксического воздействия на лейкоциты цельной крови человека) и молекулярно-генетических (ПЦР) методов, а также четкого методологического подхода к изучаемой проблеме, что характеризует Е.В. Сазанову как профессионально подготовленного исследователя. Впервые получены новые данные о патогенных, фено- и генотипических особенностях 21 штамма *Y. pestis* – кандидата в учебные. Установлено, что все штаммы являются авирулентными для аутобредных белых мышей. Анализ результатов комплексного исследования штаммов с учетом тематических планов обучения позволил диссертанту отобрать 15 из них и сформировать «Набор штаммов бактерий, используемый для обучения вопросам микробиологии и методам лабораторной диагностики чумы», включающий (1 вирулентный, 8 авирулентных штаммов I группы патогенности и 6 штаммов III-IV групп патогенности). Использование предложенного набора позволяет снизить вероятность лабораторного инфицирования и обеспечить в полном объеме моделирование диагностически значимых признаков для 10 учебных занятий по освоению методов лабораторной диагностики чумы. В Государственной коллекции патогенных бактерий диссертантом депонировано 8 штаммов *Y. pestis* и 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм *Y. enterocolitica* и 1 штамм *P. multocida*.

В настоящее время для характеристики патогенных свойств штаммов *Y. pestis* применяют оценку *in vitro* фенотипических проявлений, связанных с наличием основных детерминант патогенности, наличия фрагментов их генов, а также оценку вирулентности *in vivo* на белых мышах. Еленой Владимировной было предложено применить метод оценки *in vitro* цитотоксичности штаммов, отличительной особенностью которого является их взаимодействие с лейкоцитами цельной крови человека. На основании высокой степени корреляции полученных показателей цитотоксического воздействия штаммов *Y. pestis* и их LD₅₀ для белых мышей Е.В. Сазановой впервые предложено пороговое значение для отнесения штамма к вирулентным и к авирулентным. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дополнения комплексной характеристики патогенности штаммов чумного микроба количественным показателем динамики гибели лейкоцитов крови человека в течение 48 ч при 37 °С.

Диссертантом для эффективного моделирования чумы у лабораторных животных подобраны авирулентные штаммы чумного микроба, относящиеся к трем

биоварам, а также отработаны оптимальные условия их использования (культивирования в лабораторных животных) для формирования патологоанатомической картины и стабильного выделения *Y. pestis* на плотных питательных при посеве внутренних органов. Установлено, что наиболее результативным явилось внутрибрюшинное введение штаммов *Y. pestis* EV НИИГЭ, *Y. pestis* М-1813 и *Y. pestis* 100Р6(36М) в дозе 10^8 КОЕ в сочетании (1:1) с железосодержащим морбитором – сульфатом железа. При посеве паренхиматозных органов на агаровые пластины установлено сокращение в два раза (до 24 ч) срока формирования типичных зрелых колоний, что позволяет ускорить накопление выделенной бактериальной культуры и идентификацию.

Еленой Владимировной на основании изученных фено- и генотипических особенностей штаммов разработан дифференцированный подход к применению учебного набора, обеспечивающий моделирование диагностических признаков в полном объеме для освоения методов лабораторной диагностики чумы. С целью снижения вероятности инфицирования предложен дифференцированный с учетом вирулентности подход к использованию штаммов слушателями курсов и преподавателями.

В итоге Е. В. Сазановой сформирован первый учебный набор штаммов патогенных для человека иерсиний и пастерелл, позволяющий моделировать диагностические признаки, исключив применение высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708) и максимально ограничив использование других вирулентных штаммов возбудителя чумы. Применение набора дает возможность слушателям курсов в полном объеме освоить регламентированные методы лабораторной диагностики чумы, приобрести в процессе индивидуальной работы навыки выполнения микробиологических манипуляций с *Y. pestis* в соответствии с правилами биобезопасности и снизить вероятность лабораторного инфицирования обучающихся за счет применения авирулентных штаммов чумного микроба.

Полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты представлены в виде 3 утвержденных методических рекомендаций учрежденческого уровня, учебно-методического пособия «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» и учебно-методического комплекса «Микробиология, эпидемиология и лабораторная диагностика чумы», включены 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).

Учебный набор штаммов был апробирован в 2015-2017 гг. при обучении специалистов по трем программам профессиональной переподготовки.

Материалы диссертации используют на курсах повышения квалификации (на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и выездных курсах) специалистов учреждений Роспотребнадзора, Минздрава, других министерств и ведомств Российской Федерации, стран СНГ.

Результаты исследований представлены на российских и международных конференциях и съездах. По теме диссертации опубликовано 9 статей в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России». Получен патент на изобретение.

Актуальность диссертационной работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость не вызывают сомнения. В работе Е. В. Сазановой содержатся данные по комплексной характеристике с использованием бактериологического, биохимических, иммунологических, биологического и молекулярно-генетических методов свойств авирулентных коллекционных штаммов *Y. pestis*, выделенных от больных людей, из природных очагов РФ, других стран СНГ, Китайской Народной Республики, а также штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida*, используемых в составе учебного набора для освоения методов лабораторной диагностики чумы, что подтверждает соответствие диссертационного исследования специальности 03.02.03-микробиология.

Необходимо отметить, что диссертационная работа Е.В. Сазановой – часть комплексных исследований, проводимых сотрудниками отдела образовательных программ и подготовки специалистов, направленных на совершенствование методического обеспечения подготовки специалистов по лабораторной диагностике особо опасных инфекций и снижение биориска образовательных технологий. В

настоящее время Е.В. Сазанова участвует в продолжении исследований, связанных с учебными штаммами возбудителей сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза.

Диссертационная работа выполнена на современном методическом уровне с применением технологий современной микробиологии, иммунологии и молекулярной генетики. Все выводы обоснованы и достоверны. Выполнение большого объема работ стало возможным благодаря высокой работоспособности, заинтересованности, целеустремленности, высокому уровню профессиональной подготовки, настойчивости, успешности при освоении современных методов исследования, умению планировать и проводить исследования, анализировать и обобщать полученные результаты, оформлять документы для депонирования и патентования.

Диссертационная работа Е. В. Сазановой является законченным экспериментальным исследованием, соответствующим требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Российской Федерации, и может быть представлена к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03-микробиология.

Научный руководитель,
ведущий научный сотрудник
отдела образовательных программ
и подготовки специалистов
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», к.м.н.

/Т.А. Малюкова/

Подпись Т.А.Малюковой заверяю
начальник отдела кадров

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

/О.В. Шумигой/



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.