

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Рыбкина Владимира Семеновича на диссертационную работу Мазрухо Алексея Борисовича **«ПАНКРЕАТИЧЕСКИЙ ПЕРЕВАР ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ - ПИТАТЕЛЬНАЯ ОСНОВА СРЕД ДЛЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА И ЧУМНОГО МИКРОБА»**, представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Актуальность выбранной темы. В настоящее время во многих регионах земного шара, включая территорию Российской Федерации и сопредельные с ней государства отмечается сохранение стойких очагов чумы. Динамика заболеваемости холерой в мире в последние десятилетия свидетельствует о существовании потенциальной опасности расширения эпидемического процесса, обуславливающего продолжение седьмой пандемии.

Надежное и своевременное обнаружение этих опасных возбудителей в объектах внешней среды и в биологическом материале от больных животных и людей, эффективная лабораторная диагностика таких особо опасных заболеваний обеспечивается своевременным проведением соответствующих противоэпидемических мероприятий.

Очевидна необходимость совершенствования эпидемиологического надзора за чумой и холерой в целом и его важнейшей составляющей – лабораторной диагностики. Успехи человечества в борьбе с инфекционными болезнями во многом зависят от развития методов выделения, культивирования и идентификации их возбудителей, для чего обязательно использование разнообразных питательных сред.

Вследствие высокой себестоимости и нестандартности используемых основ для питательных сред на протяжении многих лет существует необходимость в замене мяса, рыбы на непищевое сырье. Одним из значимых и перспективных направлений решения этой проблемы является изучение возможности использования биомассы микроорганизмов в качестве исходного сырья для микробиологических питательных основ и сред. Данный подход будет способ-

ствовать снижению себестоимости питательной среды за счет использования непищевых компонентов.

В силу сказанного, выполненная работа Мазрухо А.Б. по разработке технологии изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) и изучение возможности его использования в качестве питательной основы сред для холерного вибриона и чумного микроба является весьма современной, актуальной и реально представляет импортозамещение в области производства отечественных высококачественных питательных сред.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертантом на защиту выносятся 6 положений, которые аргументировано и последовательно раскрыты в содержании диссертации, в представленных печатных работах автора, включая 3 патента на изобретение, 31 научных публикации, в том числе в 14 рецензируемых журналах ВАК. Выводы в диссертационной работе (7) четко обоснованы, адекватно отражают большой фактический материал, представленный в работе.

Достоверность и новизна исследования. При выполнении исследования соискатель использовал физико-химические, микробиологические, биологические, цитологические, серологические, статистические методы исследований, что, несомненно, характеризует его как знающего, высококвалифицированного научного сотрудника, умело использующего современные методики.

Достоверность полученных результатов и выводов обоснована адекватным выбором методов исследования, их подробным описанием, большим объемом проведенных экспериментов, достаточным для решения каждой из поставленных задач и корректной статистической обработкой полученных данных.

Научная новизна работы Мазрухо А.Б. включает разработку белкового гидролизата нового типа – панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД), способ изготовления которого защищен патентом на изобретение (Патент РФ №2375441).. Разработанный белковый гидролизат можно рассматри-

вать в качестве универсальной питательной основы, в равной степени обеспечивающей потребности как холерного вибриона, так и чумного микроба.

Созданный препарат превосходит используемые в практике средоварения белковые гидролизаты отечественного и импортного производства и может быть использован не только в качестве моноосновы питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба различного назначения, но и в качестве главного компонента универсальной питательной среды для обоих указанных микроорганизмов.

Впервые показаны преимущества ПППД перед используемыми в микробиологической практике белковыми гидролизатами по биологическим показателям (в составе питательных сред) в отношении холерного вибриона и чумного микроба.

Впервые показана возможность эффективного использования ПППД в качестве универсальной моноосновы питательных сред различного назначения для холерного вибриона.

Впервые на основе ПППД создан комплекс питательных сред для культивирования, выделения и идентификации по биохимическим признакам холерного вибриона, превосходящих по ряду биологических показателей существующие аналоги. (Патент РФ № 2392310).

Впервые продемонстрированы преимущества разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона перед используемыми в практике средами аналогичного назначения.

Впервые показана возможность использования ПППД в качестве моноосновы питательных сред для культивирования чумного микроба при 28°C и 37°C.

Впервые на основе ПППД сконструирована агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C, являющаяся единственной монокомпонентной по питательному субстрату и самой малозатратной из предложенных ранее сред аналогичного назначения и превосходящая последние по ряду биологических показателей (Патент РФ № 2350656).

Впервые на основе ПППД сконструирована экономически выгодная агаризованная питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C

Результаты апробации разработанных автором питательных сред на основе ПППД в ходе тактико-специальных учений специализированной противоэпидемической бригады (СПЭБ) показали их высокую эффективность и возможность включения в мобилизационный резерв бригад для специфической индикации ПБА и лабораторной диагностики чумы и холеры.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Значимость выполненной работы Мазрухо А.Б. для медицинской микробиологии состоит в доказанной возможности использования непищевой основы для разработки универсальной питательной среды как основы для культивирования возбудителей чумы и холеры.

Практическая ценность работы состоит в том, что проведенные исследования позволили разработать технологию получения стандартной питательной среды для культивирования возбудителей чумы и холеры, подготовить в соавторстве два нормативно-методических документа федерального уровня, восемь комплектов нормативной и эксплуатационной документации на разработанные питательные среды.

Разработанные автором питательные среды прошли широкую апробацию на базе различных практических учреждений Роспотребнадзора (ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция Роспотребнадзора»; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»), Министерства обороны РФ (ФГКУ «1002 ЦГСЭН») и Министерства здравоохранения (бактериологическая лаборатория МБУЗ ГБСМП им. Н.А. Семашко г. Ростова-на-Дону) в ходе мониторинга объектов окружающей среды и исследования материала от людей на наличие холерного вибриона, мониторинга состояния природных очагов чумы. Следует отметить, что даже на этапе лабораторных испытаний использование питательных сред на основе ПППД способствовало реальному обеспечению

санитарно-эпидемиологического благополучия населения Ростовской области по холере.

Характеристика содержания диссертации, степень завершенности исследования.

Диссертационная работа Мазрухо А.Б. структурно построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, иллюстрирована 39 таблицами и тремя рисунками. Библиография представлена 524 работами, в том числе 347 - отечественными, 177 – иностранными авторами и изложена на 302 страницах компьютерного текста.

Особо хочу отметить, что все основные разделы диссертации, раскрывающие актуальность, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, объект, структуру исследований, получение, анализ и обобщение результатов, формулирование выводов, апробацию и внедрение в практику разработанной питательной основы и сконструированных сред выполнены лично автором.

Автор во **введении** достаточно ясно обосновал актуальность выбранной диссертационной темы, четко сформулировал цель и задачи исследований, представил несомненные факты новизны работы, её практическую значимость, сформулировал основные положения, выносимые на защиту.

Представленный **обзор литературы** освещает состояние проблемы конструирования различных питательных сред для выделения и культивирования возбудителей чумы и холеры и позволяет судить об актуальности выбранного соискателем направления исследований, их приоритетности, важности, как для теоретического решения отдельных сторон этого процесса, так и открывающейся перспективы в практической реализации. Анализ литературы убеждает в актуальности, необходимости и целесообразности проведения исследования по поиску и разработке технологии получения питательных сред на основе непищевых компонентов.

Вторая глава диссертации «**Материал и методы**» посвящена детальному описанию методических приемов, которые соискатель применял при проведении исследования. Для решения поставленных задач были использованы современные микробиологические методы: микроскопические, культуральные, биохимические, серологические, молекулярно-генетические и статистические, которые были корректно выбраны и обеспечили успешное проведение исследования. Важно, что соискатель при исследовании изучал свойства разработанных новых питательных сред в сравнении с принятыми коммерческими и лабораторными средами, что дополнительно свидетельствует в пользу высокой достоверности результатов.

В последующих главах работы соискатель поэтапно освещает большой объем выполненного исследования, начиная с оптимизация технологического процесса изготовления питательной основы – панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД). В **главе 3** с целью поиска оптимального сырья он провел исследование различных марок пекарских дрожжей, определения оптимальных условий для проведения панкреатического гидролиза плотности суспензии, изучение различных методов ингибирования собственных дрожжевых ферментов в гидролизуемых смесях, подбора дозы панкреатина сухого для проведения панкреатического гидролиза. Результатом этих исследований стала новая технология получения панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД).

В **главе 4** соискатель приводит результаты сравнительной оценки панкреатического перевара пекарских дрожжей и других белковых гидролизатов, используемых в качестве основ микробиологических питательных сред.

На основании результатов исследования соискателем показано, что разработанный белковый гидролизат ПППД является наиболее эффективным и экономически выгодным среди протестированных в ходе настоящей работы отечественных и зарубежных аналогов в аспекте создания на его основе как отдельных агаризованных сред для возбудителей чумы и холеры, так и универсальной питательной среды для обоих микроорганизмов.

Глава 5 содержит материалы по изучению возможности создания на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованных питательных сред для культивирования чумного микроба при 28⁰С и 37⁰С.

На основании результатов проведённых лабораторных испытаний, соискатель убедительно показал, что разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 28⁰С может являться полноценной альтернативой используемым в лабораторной практике питательным средам: Весьма важно, что такая среда обеспечивает выявление штаммов чумного микроба, изолированных из различных природных очагов и отличающихся друг от друга по вирулентности.

Разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37⁰С по всем изученным биологическим показателям превосходит все использованные контрольные среды. Она запатентована как составляющая способа определения заражённости продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях ЧС.

Апробация разработанных на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей питательных сред для чумного микроба в ходе тактико-специального учения СПЭБ убедительно показала, что они могут стать ключевыми составляющими мобилизационного резерва бригад.

В главе 6 соискателем показаны результаты создания комплекса из 8 питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей.

Разработанный им щелочной агар на основе ПППД не только соответствует критериям качества, регламентированным действующими методическими указаниями, но и превосходит используемый в практике аналог – коммерческий щелочной агар по ряду биологических показателей.

Сконструированная Мазрухо А.Б жидкая накопительная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения холерного вибриона по результатам сравнительного тестирования с использованием 28 музейных штаммов *V.cholerae* различных

биоваров и серогрупп превосходила используемый в практике аналог по основным биологическим показателям.

Результаты модельных опытов по выделению холерного вибриона из смесей, имитирующих клинический материал, показали преимущество сред на основе ПППД перед традиционными основным пептоном и щелочным агаром и создают реальные возможности эффективного использования разработанных сред для исследования материала от людей.

Разработанный соискателем на основе ПППД бульон по основным биологическим показателям не уступает контрольной среде – традиционно используемому для культивирования и изучения свойств холерного вибриона бульону Мартена и в то же время обеспечивает продукцию СТ *in vitro* и возможность оценки гемолитической активности в пробе Грейга всех исследованных штаммов холерного вибриона.

Предлагаемая соискателем питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях не уступает контрольной среде Хью-Лейфсона по дифференцирующим свойствам в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов (164 штамма возбудителя холеры) и при этом характеризуется значительно более низкой себестоимостью.

Разработанная соискателем питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот не уступала контрольной среде Мёллера по дифференцирующим свойствам в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов. Вместе с тем, сконструированная среда имеет ряд преимуществ перед контрольной: низкую себестоимость исходного сырья; моноосновность среды, что упрощает технологический процесс её изготовления и улучшает стандартизуемость и экономическую эффективность.

Соискателем разработана глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний которая не уступала коммерческой контрольной среде

Клиглера по дифференцирующим свойствам в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов.

Таким образом, Мазрухо А.Б. разработаны и предложены для внедрения в практику лабораторной диагностики чумы и холеры ряд новых питательных сред, большинство из которых в настоящее время проходят процедуру государственной регистрации, завершение которой ожидается в ближайшее время.

Государственная регистрация и постановка на производство питательных сред на основе ПППД безусловно будет способствовать совершенствованию лабораторной диагностики чумы и холеры, как составляющей эпидемиологического надзора за этими опасными инфекционными болезнями.

В разделе **«Заключение»** соискатель проводит глубокий анализ результатов собственных исследований, сопоставляя их с данными литературы, показывает новое перспективное направление в производстве питательных сред, возможности использования ПППД в качестве основы селективно-дифференциальных питательных сред для холерного вибриона, чумного микроба и других возбудителей опасных инфекционных болезней. Важным аспектом развития соискатель обоснованно считает не только создание достойной экономически выгодной альтернативы традиционным мясным, казеиновым и рыбным белковым гидролизатам, но также упрощение технологического процесса изготовления, стандартизации и контроля качества дрожжевых питательных сред.

Выводы работы четко изложены, аргументированы, вытекают из фактического материала исследования и отвечают поставленным задачам.

Список литературы составлен по ГОСТу и в основном представлен современными источниками с глубиной поиска в течение последних 10 лет.

Результаты исследования прошли широкую апробацию на различного уровня всероссийских и научно-практических конференциях комиссионных испытаниях, а при государственной регистрации разработанных новых питательных сред получили положительную оценку.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями и полно отражает основное содержание диссертации.

Высокий методический уровень, большой объем выполненных исследований, ценность и достоверность полученных результатов, их глубокая и аргументированная трактовка позволяют считать, что выполненную работу можно квалифицировать как научное достижение, сформировавшее новое научное направление по конструированию питательных сред для выделения, культивирования, идентификации и индикации возбудителей чумы и холеры.

В целом положительно оцениваю диссертационную работу Мазрухо А.Б. Принципиальных замечаний к работе нет. В процессе рецензирования, однако, возникли несколько вопросов и замечаний.

Вопросы.

- Как стандартизируется исходный ПППД? В каком виде (жидкий, сухой) он хранится?

- Можно ли говорить о селективности сред на основе ПППД при исследовании проб из внешней среды (вода, сточные воды, трупы животных и пр.). Не препятствует ли выделению возбудителей чумы, холеры посторонняя микрофлора в объектах исследования?


- Что убеждает Вас в возможности использования сред на основе ПППД при автоматизации лабораторного исследования?

В качестве замечаний отмечу излишнюю детализацию разделов в оглавлении и тексте работы, имеющиеся повторы в разных местах работы (в частности повторы рецептов разработанных автором сред), стилистические шероховатости, небольшие опечатки.

Заключение. Диссертационная работа Мазрухо Алексея Борисовича «Панкреатический перевар пекарских дрожжей - питательная основа сред для холерного вибриона и чумного микроба», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 «микробиология», является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение важнейшей научной задачи, имеющей большое практическое значение



10

по разработке и применению новых питательных сред для выделения, культивирования, идентификации и индикации возбудителей таких особо опасных инфекций как чума и холера, что полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» №842, утвержденного правительством РФ от 24 сентября 2013 г., предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а автор диссертационной работы Мазрухо Алексей Борисович заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03. – «микробиология».

Официальный оппонент,
доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры микробиологии и
вирусологии Астраханского государственного
медицинского университета  Рыбкин Владимир Семенович

Адрес: РФ, 414000, г. Астрахань, ул.Бакинская, 121, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Подпись д.м.н., профессора
В.С. Рыбкина заверяю


Подписи заверяю 
Ученый секретарь ФГБОУ ВО
«Астраханский государственный
медицинский университет»
Минздрава России,
к.м.н., доцент Ничога В.Д.