

ОТЗЫВ

на диссертацию **Мазрухо Алексей Борисовича**

«Панкреатический перевар пекарских дрожжей питательная основа сред для холерного и чумного микроба», представленная к защите на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Седьмая пандемия холеры шагает по странам мира, представляя основную проблему общественного здравоохранения. Возможен завоз холеры и на территорию России. Возбудители холеры: холерные вибрионы O1, O139 серогрупп (классические холерные вибрионы - *V.cholerae cholerae*, холерные вибрионы эльтор - *V.cholerae eltor* и холерные вибрионы не O1 - *V. cholerae O139*). Некоторые представители других серогрупп - *V.cholerae non O1, non O139 (non O1/O139)* иногда вызывают холероподобные заболевания. Совершенствование лабораторной диагностики холеры актуально и зависит от качества элективных, селективных, дифференциальных питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерных вибрионов, так как холерная инфекция включена в перечень особо опасных инфекций по санитарной охране территории, создающих ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения (ММСП, 2005; СП 3.4.2318-08; СП 1.3.2521 - 09).

Не менее актуально совершенствование качества питательных сред при эпидемиологическом надзоре за чумой, при эпизоотологическом мониторинге для оценки и прогнозов эпизоотической активности в биотопах природных очагов чумы. На территории Российской Федерации существует 11 природных очагов чумы. Из них 8 очагов на территории юга России (ЮФО и СКФО), кроме территории Краснодарского края, а также на территории Прикаспия, Р.Алтай, Р.Тыва. Общая площадь энзоотичной по чуме территории составляет 254131км². Следует отметить, что при исследовании полевого материала (грызуны, блохи, клещи, погадки, почва из нор, шерсть грызунов, остатки столов хищных птиц и др.) в разные годы на отдельных территориях выделяли возбудителей чумы (I группа патогенности) не только *Y. pestis subsp. pestis* (основной подвид), но и *Y. pestis altaica*, *Y.pestis hissarica*, *Y.pestis ulegeica* и другие (МУ 3.1.3.2355 – 08, СП 3.1.7.2492 – 09, МУК 4.2.2940).

Мазрухо А.Б. в связи с необходимостью совершенствования эпидемиологического надзора за холерой и чумой с учётом результатов мониторинга объектов окружающей среды и результатов лабораторных исследований поставил перед собой цель: разработать технологию изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) и изучить возможности его использования в качестве питательной основы сред для культивирования холерных и чумных микроорганизмов.

Для достижения цели автор чётко сформулировал задачи: использовать различные марки хлебопекарных дрожжей в качестве исходного сырья, определить оптимальные условия панкреатического гидролиза дрожжей для получения белкового гидролизата, оптимизировать стадии технологического процесса изготовления основы ПППД и использовать монооснову для приготовления сред и лабораторных исследований на наличие возбудителей холеры и чумы.

Научная новизна исследований Мазрухо А.Б. заключается в том, что разработана питательная основа – ПППД, определены требования к сырью, подобраны препараты панкреатина КРС для проведения гидролиза дрожжей, определён способ предварительного ингибирования собственных дрожжевых ферментов, определены оптимальные условия гидролиза и составлена схема технологического процесса «Способ получения белкового гидролизата», защищённая патентом на изобретение (патент РФ № 2375441).

Впервые выявлены преимущества ПППД в сравнении с другими гидролизатами по биологическим показателям для холерных вибрионов и возбудителей чумы. Впервые показана возможность использования ПППД в качестве универсальной моноосновы питательных сред для изучения различных свойств холерных вибрионов. Впервые на основе ПППД создан комплекс питательных сред и получен патент РФ № 2392310 «Среда обогащения для холерного вибриона» и доказаны преимущества этих сред при мониторинговании объектов окружающей среды и при проведении тактико-специального учения (ТСУ-СПЭБ) по локализации очага холеры.

Впервые показана возможность использования ПППД в качестве моноосновы питательных сред для культивирования возбудителей чумы при 28⁰ С и 37⁰ С. На основе ПППД сконструирована агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37⁰С. Эта среда запатентована как способ определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях чрезвычайных ситуаций (патент РФ № 2350656).

На защиту вынесены решения задач в соответствии с поставленной целью. Основные положения диссертации доложены: на заседаниях ПК (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (Ростов-на-Дону, на научных конференциях в 2002, 2004, 2006, 2010, 2012 г.г., 2013-2015гг.

Диссертация изложена на 302 страницах, содержит введение, обзор литературы, «Материалы и методы»), 4 главы собственных исследований, заключение, выводы, иллюстрирована 39 таблицами и тремя рисунками. Библиография – 347 отечественных и 177 иностранных работ.

Мазрухо А.Б. выполнил все задачи в соответствии с поставленной целью.

Доказана правомерность и перспективность использования хлебопекарных дрожжей - основного сырья для проведения гидролиза с использованием препаратов панкреатина крупного рогатого скота сухого,

ферментативная активность которого была стандартизована в соответствии с международной системой единиц для изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) и сред из него. Составлена схема технологического процесса. Выбран приоритетный метод осветления ПППД путём отстаивания на холоду поскольку он позволяет получить продукт с содержанием необходимых компонентов для оптимального роста холерных и чумных микроорганизмов.

Низкая себестоимость и стандартность исходного сырья, достаточное количество отечественных предприятий, выпускающих указанную продукцию, простая технология изготовления (ПППД) и сред, создают предпосылки конкурентоспособности и востребованности данного белкового гидролизата на современном рынке отечественных и импортных микробиологических питательных сред.

Сконструирована стандартизованная универсальная основа ПППД для питательных сред при лабораторной диагностике холеры и чумы. Для диагностики холеры сконструированы среды для культивирования, выделения и идентификации представителей вида холерных вибрионов на основе ПППД: щелочной агар, жидкая накопительная питательная среда, бульон, питательная среда для идентификации холерных вибрионов по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях, питательная среда для идентификации холерных вибрионов по признаку ферментации аминокислот (лизин, орнитин, аргинин), глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда для идентификации холерных вибрионов на этапе отбора подозрительных колоний при посеве биоматериала от людей и из объектов окружающей среды. Оценку энтеротоксинпродуцирующей активности штаммов холерных вибрионов, культивированных на опытных и контрольных средах, проводили путём постановки теста кожной проницаемости и титрованием в культуре клеток СНО – К1.

Для лабораторной диагностики чумы разработаны питательные среды на основе ПППД для культивирования возбудителей при 28°C и 37°C. Среда для культивирования чумного микроба при 28°C является полноценной альтернативой питательным средам ЧПС и агару Хоттингера. Однако, при 28°C на плотных средах снижена продукция фракции I (FI) из-за «слабой экспрессии генетического детерминанта, кодирующего синтез антигена». Сконструированная автором на основе ПППД питательная среда для культивирования *Y.pestis* при 37°C, оказалась единственной монокомпонентной по питательному субстрату из предложенных для этой цели ранее и превосходит последние по скорости роста, накоплению биомассы и FI. Выявление продукции капсульного антигена (FI) у чумных микроорганизмов проводили серологическими методами: реакции агломерации объёмной (РАО), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), методом флюоресцирующих антител (МФА). Изолированные на опытных средах на основе ПППД из проб № 1 и № 2 культуры чумного микроба наряду с серологическими тестами были также идентифицированы методом ПЦР с помощью видоспецифических праймеров.

Написаны восемь комплектов нормативной и эксплуатационной документации на разработанные питательные среды.

По результатам данной работы перспективным представляется разработка на основе ПППД сред для автоматических устройств, а также хромогенных сред, которые были бы конкурентоспособны. Следует отметить, что разработке и совершенствованию питательных сред придаётся особое значение, так как идентификация, внутривидовая дифференциация и определение происхождения выделенных штаммов важно особенно при террористических актах с применением патогенных биологических агентов, а также при выявлении завозных случаев особо опасных инфекций (чума, холера и др.)

Автор диссертации проявил себя вдумчивым и зрелым исследователем, за 15-летний период работы по 7-и научным темам. Он чётко сформулировал цели и задачи. Исследования защищены тремя патентами.

На препараты оформлено 8 нормативных и эксплуатационной документации. Методические подходы к качеству питательных сред вошли в состав МУК 3.3.2.2124 - 06 и МУК 4.2.2218 - 07, в практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» под редакцией Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М. ЗАО «Шико», 2013.

По теме диссертации опубликованы 31 работа, из них 14 в периодических изданиях из перечня научных журналов, утверждённых ВАК. Изучено 347 литературных источников отечественных авторов и 177 иностранных.

Диссертация Алексея Борисовича Мазрухо «Панкреатический перевар пекарских дрожжей питательная основа сред для холерного и чумного микроба» по актуальности, объёму работы и качеству исследований, значению для эпидемиологического надзора и лабораторной диагностики по холере и по чуме отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Доктор медицинских наук, СНС,
академик РАЕ, врач-эпидемиолог
ФКУЗ «Причерноморская ПЧС» Роспотребнадзора

Гальцева Г.В.
Гальцева Г.В.

Подпись Гальцевой Г.В. удостоверяю
Специалист по кадрам ФКУЗ
Причерноморская ПЧС» Роспотребнадзора

Цаллаева Е.А.
Цаллаева Е.А.

