



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ
В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного
Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Вос-
тока»

**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора**

664047 Иркутск, Трилиссера, 78

Тел. 22-01-35, факс 22-01-40

E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

<http://www.irkutsk.ru/chumin>

ОКПО 01898090, ОГРН 10223801543017

ИНН/КПП 3811015807/381101001

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФКУЗ Иркутский
научно-исследовательский
противочумный институт
Роспотребнадзора
докт. мед. наук, профессор

С. В. Балахонов

" 8 " февраля 2017 г.

08.02.2017 № 105
На № _____

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Мазрухо Алексея Борисовича "Панкреатический перевар пекарских дрожжей - питательная основа сред для холерного вибриона и чумного микроба", представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования. Контроль инфекционной заболеваемости является одной из актуальных проблем здравоохранения в связи с существованием в мире рисков возникновения чрезвычайных ситуаций, угрожающих санэпидблагополучию населения. Возможность завоза особо опасных инфекционных заболеваний (чума, холера) из эндемичных очагов на Азиатском, Американском и Африканском континентах (Кутырев В.В. с соавт., 2011; и др.), увеличивающаяся с каждым годом миграция населения, наличие активных природных очагов чумы на территории России, заболевания легочной и бубонной чумой в последние годы на Мадагаскаре (Иванова Н.Г. с соавт., 2001), в Китае и России требуют поиска новых и совершенствования существующих путей предотвращения эпидосложнений и, в первую очередь, совершенство-

вания эпиднадзора за этими инфекциями в целом и его основной составляющей – лабораторной диагностики (МУК 4.2.2870-11). Успех в этом отношении зависит от методов выделения, культивирования и идентификации возбудителей. Набор внедряемых питательных сред расширяется, ведется поиск универсального, стандартизованного экономически выгодного и доступного сырья для их приготовления (Антонычева М.В., 2005; Шепелин А.П., 2015).

Возбудители чумы и холеры полноценно растут на средах, содержащих мясные и казеиновые гидролизаты с широким спектром аминокислот. Высокая себестоимость и нестандартность их побудила исследователей искать заменители мяса, субпродуктов, казеина, рыбы на непищевое сырье (Милютин В.Н., 1975; Меджидов М.М., 1986; Курилова А.А., 2009).

Одним из перспективных направлений решения этой проблемы (Черкасова Л.С. с соавт., 2008, Лабинская А.С. с соавт., 2010) является изучение возможности использования биомассы микроорганизмов (в т.ч. и дрожжей) в качестве исходного сырья для питательных основ и сред. Идея использования дрожжей в средоварении получила развитие еще в 20-40-ых гг. XX века. По материалам ряда авторов (Альпер-Юльчевская Б.А., 1940, Шевченко Ф.И., 1942), среды на дрожжевых питательных основах являлись адекватной заменой мясо-пептонному бульону и агару.

С 1941 по 1947 гг. предпринимались попытки использования дрожжевых сред в производстве вакцин и дизентерийного бактериофага. Н.Б. Александровской (1956), А.В. Аничевым с соавт. (1970) предложены оптимальные способы и условия гидролиза пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для получения из них полноценной питательной основы, содержащей большой набор аминокислот и витаминов.

В 2000 - 2013 гг. появляются публикации по применению аутолизатов и экстрактов пекарских дрожжей в качестве стимуляторов роста микроорганизмов и самостоятельных питательных основ. Однако они имеют ряд недостатков. Так дрожжевые экстракты имеют низкие показатели общего и аминного азота, являясь источником витаминов, а не аминокислот. Аутолизаты пекарских дрожжей, хотя и имеют богатый аминокислотный состав, но стандартизация их затруднена в связи с неуправляемостью процесса аутолитического гидролиза за счет собственных дрожжевых ферментов.

Продукт, получаемый в результате такой ферментативной реакции, содержит пептиды, скорость и степень усвоения которых бактериями переменна, что ведет к неравномерности развития в среде микробной популяции и к накоплению веществ, ин-

гибирующих рост микроорганизмов. Это ограничивает применение таких сред при добавлении к ним индикаторов и затрудняет осветление питательной основы.

Диссертантом представляется перспективным для гидролиза пекарских дрожжей использовать стандартные ферментативные препараты панкреатина крупного рогатого скота с известной активностью его основных компонентов – трипсина, амилазы и липазы. При этом преимущества панкреатического гидролиза пекарских дрожжей – это его управляемость и прогнозируемость, возможность дозирования фермента.

Низкая себестоимость и стандартность (соответствие ГОСТ 171-81 и ТУ) исходного сырья – дрожжей хлебопекарных прессованных и панкреатина крупного рогатого скота сухого; простая технология изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей и сред из него, создают предпосылки конкурентоспособности и востребованности данного белкового гидролизата на рынке отечественных и импортных микробиологических питательных сред, что особо важно и в отношении импортозамещения.

С учетом изложенного тема диссертационной работы Алексея Борисовича Мазрухо "Панкреатический перевар пекарских дрожжей - питательная основа сред для холерного вибриона и чумного микроба", цель которой заключается в разработке технологии изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) и изучении возможности его использования в качестве питательной основы сред для холерного вибриона и чумного микроба, несомненно, актуальна и соответствует требованиям науки и практики.

Новизна полученных результатов и выводов диссертации заключается в разработке и защите патентом на изобретение (патент РФ № 2375441) способа изготовления новой питательной основы ПППД: определены требования к исходному сырью (дрожжам хлебопекарным прессованным); подобраны препараты панкреатина крупного рогатого скота сухого для гидролиза дрожжей хлебопекарных; определены способы предварительного ингибирования собственных дрожжевых ферментов; установлены факторы, влияющие на панкреатический гидролиз дрожжей и найдены оптимальные условия его проведения, этапы и стадии получения ПППД увязаны в технологическую схему.

Впервые показаны преимущества ПППД перед используемыми в практике белковыми гидролизатами по биологическим показателям (в составе питательных сред) в

отношении холерного вибриона и чумного микроба, в том числе, в направлении создания на его основе универсальной питательной среды для обоих микроорганизмов.

Впервые показана возможность эффективного использования ПППД в качестве универсальной моноосновы целого комплекса питательных сред разного назначения для холерного вибриона. Входящая в состав комплекса жидкая накопительная питательная среда запатентована (Патент РФ № 2392310 «Среда обогащения для холерного вибриона»).

Новыми являются данные, показывающие преимущества разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред для выделения и идентификации холерного вибриона перед используемыми в практике средами в ходе мониторинга объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона и тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ по локализации очага холеры.

Впервые показана возможность использования ПППД в качестве моноосновы питательных сред для культивирования чумного микроба при 28°C и 37°C, не уступающих по биологическим показателям применяемым в лабораторной практике средам.

При этом агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C является единственной монокомпонентной по питательному субстрату и самой малозатратной из предложенных ранее сред аналогичного назначения и превосходит последние по ряду биологических показателей. Сконструированная среда запатентована как составляющая способа определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях чрезвычайных ситуаций (патент РФ № 2350656).

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов. Теоретическая значимость настоящей работы заключается в том, что впервые дано научное обоснование к разработке новой универсальной основы питательных сред ПППД, представлена ее характеристика по физико-химическим и биологическим показателям. Показаны преимущества ПППД перед используемыми в практике в качестве питательных основ белковыми гидролизатами отечественного и импортного производства.

Предложены критерии оценки белковых гидролизатов в отношении возможности создания на их основе универсальной питательной среды, позволяющей культивировать и выделять оба микроорганизма.

Полученные диссертантом данные о характере роста штаммов *V.cholerae* и *Y.pestis* на средах, включающих предлагаемую основу в качестве единственного питательного субстрата, говорят о том, что ПППД обеспечивает потребности указанных микроорганизмов и может служить для их всестороннего и углубленного изучения.

Практическая значимость исследования заключается в разработке технологии изготовления новой универсальной основы питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба – ПППД. По результатам её комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная ученым советом Ростовского-на-Дону противочумного института и утвержденная директором института.

На основе ПППД сконструированы щелочной агар и жидкая накопительная среда для культивирования и выделения холерного вибриона. На указанные препараты получено положительное комиссионное заключение, оформлена нормативная документация и осуществляется процедура их государственной регистрации.

На основе ПППД разработаны бульон для культивирования холерного вибриона, питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях, питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот и глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний. Указанные среды прошли комиссионные испытания, на них оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная ученым советом Ростовского-на-Дону противочумного института и утвержденная директором института. На основе ПППД разработаны питательные среды для культивирования чумного микроба при 28°С и 37°С. По результатам комиссионных испытаний сред получено положительное заключение. На препараты оформлены нормативная и эксплуатационная документация.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Положения, выносимые на защиту, выводы и заключение диссертации обоснованы и отражают результаты проделанной работы. О достоверности результатов работы говорит значительный объем тщательно проведенных исследований с применением современных бактериологических, серологических, биохимических, биотехнологических, цитологических (СНО-К 1), биологических и др. методов, соответствующих ме-

тодов статистической обработки данных и личный вклад автора в разработку проблемы.

Все основные разделы диссертации, раскрывающие актуальность, научную новизну теоретическую и практическую значимость, объект, структуру исследований, получение, анализ и обобщение результатов, формулировка выводов, апробация и внедрение в практику разработанной питательной основы и сконструированных сред выполнены лично автором. Часть разделов 6.2 – 6.5 главы 6 основывается на материалах, полученных в соавторстве с Д.И. Каминским, что отражено в опубликованных совместных научных работах в изданиях из перечня ВАК и патенте РФ № 2392310.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом. Диссертационная работа А.Б. Мазрухо выполнена во ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора в рамках семи плановых государственных научных тем.

Рукопись диссертации А.Б. Мазрухо оформлена традиционно. Текст занимает 302 страницы машинописи, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Список литературы представлен 524 работами, в т.ч. 347 – отечественных и 177 зарубежных авторов. Диссертационная работа документирована 39 таблицами и тремя рисунками. Материал изложен четко и доходчиво.

Раздел «Введение» содержит основную информацию о проделанной работе. В нем диссертант обосновывает актуальность выполнения работы, цель и задачи исследования, отражает научную новизну и практическую значимость диссертации, приводит данные об апробации сред, опубликованных работах, структуре и объеме диссертации, представляет выносимые на защиту основные положения.

В главе «Обзор литературы» автор останавливается на ситуации конца 1990-х гг. в России, когда остро встал вопрос о развитии производства медицинских иммунобиологических препаратов, обеспечивающих безопасность страны. Госсанэпиднадзору, Минздравмедпрому и РАМН Правительством РФ было предложено повысить требования контроля препаратов медицинского назначения и модернизировать производство питательных сред (Постановление Правительства РФ от 18.12.1995 г.).

В обзоре с учетом новых теоретических аспектов, касающихся физиологии микроорганизмов (Ахапкина И.Г. с соавт.; 2001, Бухарин О.В., 2009) диссертант рас-

смачивает физиологические особенности и питательные потребности возбудителей особо опасных инфекций – чумного микроба и холерного вибриона, использование различных видов сырья для изготовления основ питательных сред для их выделения и культивирования, в т.ч. на основе гидролизатов белков животного происхождения, гидролизатов растительного происхождения, использования различных препаратов из микроорганизмов.

В обзоре особое внимание уделяется дрожжам рода *Saccharomyces*, которые помимо высокого содержания белка в клетке имеют тонкую регуляцию биохимических процессов факторами окружающей среды (Карташёва Л. Д. с соавт., 1994; Домотенко Л. В. с соавт., 2009; Shi J. et al., 2006). Эти дрожжи экономически выгодны, являются доступным, экологически безопасным сырьём. Панкреатические перевары пекарских дрожжей содержат вещества, образующиеся естественно в организме животных (человека) и составляющие основу питания патогенных бактерий. В заключительной части обзора литературы автор говорит о перспективах использования пекарских дрожжей в качестве сырья для изготовления белковых питательных основ (пептонов), подчеркивая, что их эффективному использованию способствует современное состояние биотехнологии (прикладной генетики, метаболической и клеточной инженерии). Важной составляющей модернизации технологии производства дрожжей является также повышение синтеза протеинов с помощью изменения питания и регуляции путей ферментации (Бухарин О. В., 2009).

Собственные исследования диссертанта выполнены с применением представленных в главе «Материалы и методы» современных микробиологических, серологических, биохимических, биотехнологических, цитологических и биологических методов. В исследовании использовано 50 штаммов *V. cholerae* O1, 0139 (в т.ч. три тест-штамма для контроля питательных сред) и 11 штаммов *Y. pestis*, отличающихся по вирулентности и месту выделения (в т.ч. три тест-штамма). Для оценки дифференцирующих свойств разработанных и контрольных питательных сред использованы штаммы других микроорганизмов: *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Все штаммы из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

На первом этапе исследований, диссертантом были подобраны оптимальные для изготовления ПППД коммерческие марки определённых рас прессованных хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae*: «Особые» Ростовского-на-Дону и «Дрожжи хлебопекар-

ные прессованные» Черкесского дрожжевых заводов. В качестве перспективных, рассмотрены дрожжи хлебопекарные «Экстра», «Воронежские дрожжи», марки «Градус» и «Хлебное дерево» Ростовского-на-Дону дрожжевого завода и продукция Санкт-Петербургского дрожжевого завода.

Анализ кривых гидролиза дрожжей выявил характерную константу нарастания скорости (по аминному азоту) на протяжении первых восьми часов при использовании марки «Особые». В дальнейшем был разработан способ изготовления ПППД, включающий 5 стадий от получения суспензии пекарских дрожжей до получения готового целевого продукта – ПППД; его фасовки, герметизации, стерилизации, этикетировки и упаковки готовой продукции.

Диссертантом установлены оптимальные параметры технологического процесса изготовления ПППД (в т.ч. плотность суспензии дрожжей, стабилизатор, метод ингибирования собственных дрожжевых ферментов, ферментный препарат, его доза, рН, температура и длительность гидролиза, методы осветления гидролизата и стерилизации).

Диссертантом сконструированы на основе ПППД следующие питательные среды: агаризованная питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C, агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C, бульон, щелочной агар и жидкая накопительная среда для выделения и культивирования холерного вибриона; питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот; питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях; глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда для выделения холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний.

В качестве контрольных в работе использованы как коммерческие зарегистрированные в установленном порядке питательные среды, так и среды лабораторного изготовления (которым нет коммерческих аналогов), рекомендованные действующими практическими руководствами и методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры и чумы (МУ4.2.2218-07, МУ 3.1.1098-2002).

В работе представлены прописи всех сред, а также перечень коммерческих белковых гидролизатов и белковых гидролизатов лабораторного изготовления, взятых в качестве препаратов сравнения для оценки ПППД как основы питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба.

ПППД охарактеризован по физико-химическим показателям (прозрачность, цветность, рН, аминный азот, общий азот, содержание хлорида натрия, углеводов, свободного триптофана, нуклеиновых кислот) и биологическим свойствам, которые определены по совокупности биологических показателей четырёх приготовленных на его основе сред: агаризованной питательной среды, жидкой накопительной питательной среды для культивирования и выделения *V.cholerae* и бульона для культивирования холерного вибриона в отношении трех тест-штаммов, агаризованной питательной среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C также в отношении трех тест-штаммов.

Диссертантом был избран путь направленного ферментативного гидролиза хлебопекарных дрожжей, ранее обоснованный, как наиболее приемлемый для получения белковых гидролизатов, характеризующихся высокой эффективностью в качестве главных компонентов бактериологических сред (Самойлова Л.В., с соавт., 1998). Разработанный метод изготовления ПППД позволил рассматривать его как изобретение «Способ получения белкового гидролизата» (Патент РФ № 2375441).

Оптимистический прогноз экономической целесообразности использования данной научной разработки для создания нового препарата на основе гидролизата пекарских дрожжей оправдался, в основном, за счёт процедуры технологического процесса. Использование коммерческого панкреатина даёт стандартность препарата по активности трипсина. Параллельно было испытано девять наиболее широко применяемых при производстве различных питательных сред в России и за рубежом белковых гидролизатов, преимущественно, из сырья животного происхождения.

Разработанный белковый гидролизат ПППД является наиболее эффективным и экономически выгодным среди протестированных в ходе 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. Преимущества ПППД перед используемыми в практике отечественными и зарубежными белковыми гидролизатами в аспекте обеспечения питательных потребностей чумного микроба послужили основой для конструирования на основе данного препарата агаризованной питательной среды для культивирования *Y.pestis* при 28°C. Среда по всем изученным показателям не уступает контрольной среде ЧПС (ФБУН ГНЦ ПМБ) в отношении каждого из взятых в исследование 11 штаммов чумного микроба и полностью соответствует требованиям МУ 3.3.2.2124-06. По

показателям чувствительности и прорастания опытная среда на порядок превосходит традиционный агар Хоттингера в отношении слабовирулентного штамма *Y.pestis* 21 КБ и двух вирулентных штаммов *Y.pestis* И-2442 и 231. Сделано заключение, что разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 28°C является полноценной альтернативой используемым в лабораторной практике питательным средам: ЧПС (ФБУН ГНЦ ПМБ) и агару Хоттингера. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что сконструированная на основе ПППД среда удовлетворяет питательным потребностям штаммов чумного микроба, изолированных из разных природных очагов и отличающихся друг от друга по вирулентности.

Оптимальной температурой для роста и размножения *Y. pestis* является 28°C, поэтому чумные бактерии на питательных средах выращивают преимущественно при этой температуре. Однако, культивирование возбудителя чумы при 37°C – температуре тела теплокровных животных и человека, способствует формированию его фенотипа, близкого к таковому при инфекционном процессе. При 37°C резко возрастает продукция ряда антигенов чумного микроба. Это послужило автору аргументацией конструирования агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C, которая отличается от предложенных ранее сред аналогичного назначения тем, что в качестве её питательной основы используют только один компонент – ПППД, в то время как при конструировании других питательных сред для данной температуры культивирования *Y.pestis* применялись различные комбинации белковых гидролизатов.

На основании результатов проведённых лабораторных испытаний разработанная агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C по всем изученным биологическим показателям превосходит все использованные контрольные среды. Обе разработанные на основе ПППД агаризованные питательные среды (для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C; для культивирования чумного микроба при 37°C) были апробированы в ходе тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ по проведению специфической индикации ПБА. Об эффективности сконструированных сред свидетельствует выделение с их помощью культуры чумного микроба из обеих учебных проб с разной степенью их контаминации вакцинным штаммом *Y.pestis* EV 1290 при двух температурах инкубации посевов, в то время как на

контрольном агаре Хоттингера чумной микроб был изолирован только из пробы с более высокой его концентрацией (при 37°C - в более поздние, чем на опытной среде, сроки).

Дальнейшие исследования автора были направлены на конструирование на основе ПППД комплекса сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона.

Наиболее высока потребность в щелочном агаре. По данным диссертанта, для обеспечения работы СПЭБ по локализации и ликвидации эпидемического очага холеры в течение двух месяцев (500 проб в сутки) требуется 4320 л готового щелочного агара. В ходе выполнения настоящей работы сконструирован щелочной агар, в котором в качестве питательной моноосновы впервые использован препарат ПППД. Среда достоверно превосходит контрольный щелочной агар производства ФГУП НПО «Микроген», по показателю прорастания и диаметру колоний классического холерного вибриона. Преимущество среды перед контрольной установлены в отношении *V.cholerae* O139 по чувствительности, которая на порядок превышает показатель контрольной среды, показателям прорастания и диаметра колоний. Эти преимущества новой среды приобретают значение в связи с эпидемической опасностью штаммов холерного вибриона этой серогруппы. Показатели сконструированной среды в отношении трех тест-штаммов холерного вибриона продемонстрировали её полное соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06.

Разработанная на основе ПППД жидкая накопительная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона по результатам сравнительного тестирования с использованием 28 музейных штаммов *V.cholerae* различных биоваров и серогрупп превосходит используемый в практике аналог (1% пептонную воду, приготовленную из «Пептона основного сухого» производства ФГУПНПО «Микроген») по основным биологическим показателям.

За 6 лет апробации разработанного на основе ПППД комплекса сред «Щелочной агар-Жидкая накопительная среда» при мониторинге поверхностных водоёмов и стоков на территории г.Ростова-на-Дону с его помощью были выделены 18 культур *V.cholerae* O1 и 438 культур *V.cholerae* не O1/ не O139, в то время как на контрольном комплексе сред «Агар щелочной сухой – Пептон основной сухой» производства ФГУП НПО «Микроген» изолирована только одна культура *V.cholerae* O1 (из сточных вод, которая была выделена также и на опытном комплексе сред) и 164 культуры холерного

вибриона не O1 / не O139 серогрупп. Следует отметить, что 85% всех изолированных в Ростовской области за шесть лет культур *V.cholerae* O1 были обнаружены только при использовании сред, сконструированных на основе ПППД в процессе их лабораторных испытаний.

В августе 2001 года из сточных вод на территории г.Ростова-на-Дону был выделен токсигенный штамм *V.cholerae* O1, сходный по генотипу (по данным VNTR – анализа) со штаммами, вызвавшими вспышку холеры в г. Казани месяцем раньше. Это позволило своевременно провести необходимый комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий. Высокая чувствительность и значительно более низкая себестоимость разработанных на основе ПППД питательных сред, их внедрение в практику лабораторной диагностики холеры существенно повысит эффективность и снизит затраты на осуществление ежегодного мониторинга водоемов.

Апробации разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред «Щелочной агар – Жидкая накопительная среда» при исследовании материала от людей (747 проб) на базе бактериологической лаборатории МБУЗ «Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко» предшествовали модельные опыты по сравнительному изучению возможности выделения на опытных и контрольных средах штаммов холерного вибриона из искусственных смесей с микробами-контаминантами.

Установлено, что на средах опытного комплекса холерный вибрион удавалось изолировать из смесей, содержащих 10 м.к./мл *V.cholerae* и от 1×10^4 до 1×10^8 м.к./мл *E.coli* и *P.vulgaris*. На контрольном комплексе сред выделение *V.cholerae* было возможным при концентрации в смеси микробов-контаминантов, не превышающей 1×10^7 м.к./мл. Результаты модельных опытов создают предпосылки возможности эффективного использования разработанных сред для исследования материала от людей.

Результаты сравнительного изучения разработанного бульона на основе ПППД для холерного вибриона и контрольной среды – бульона Мартена показали, что по биологическим показателям разработанный бульон не уступает контрольному в отношении всех 28 взятых в исследование музейных штаммов холерного вибриона. Исследована также возможность его применения для оценки продукции холерного энтеротоксина (СТ) *in vitro* с тестированием полученных из исследованных штаммов *V.cholerae* супернатантов в тесте кожной проницаемости и культуре клеток СНО-К1.

Исследование 29 штаммов холерного вибриона, выделенных из материала от людей во время вспышки холеры в г. Казани летом 2001 г., и трех токсигенных штаммов *V.cholerae El Tor*, из воды поверхностных водоемов и стоков на территории г.Ростова-на-Дону (2000-2001 гг) установило, что по величине титров СТ в указанных тестах опытная среда не уступает бульону Мартена и лишь незначительно отстает по этому показателю от одной из лучших в мире сред накопления СТ, состоящей из дорогих импортных ингредиентов – среде АКІ.

Исследование гемолитической активности 28 использованных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп в пробе Грейга показало отсутствие расхождения в результатах, полученных при использовании разработанного на основе ПППД бульона и бульона Мартена.

Результаты сравнительного изучения трех разработанных на основе ПППД питательных сред для идентификации холерного вибриона (среда для идентификации холерного вибриона по признаку расщепления глюкозы в аэробных и анаэробных условиях; среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот; агаризованная среда для идентификации холерного вибриона по признакам ферментации глюкозы и лактозы и контрольных (среда Хью-Лейфсона, среда Мёллера, агар Клиглера, соответственно), показали их полную идентичность в отношении взятых в исследование штаммов холерного вибриона и других микроорганизмов. Набор питательных сред на основе ПППД прошел успешную апробацию при проведении тактико-специального учения СПЭБ на базе мобильного комплекса в автономных условиях по индикации и идентификации холерных вибрионов.

Анализ результатов выполненной диссертации и данных литературы позволяет полагать, что в производстве питательных сред намечается новое направление. Это не только создание экономически выгодной альтернативы традиционным мясным, казеиновым и рыбным белковым гидролизатам, но также упрощение технологического процесса изготовления, стандартизации и контроля качества дрожжевых питательных сред. Продолжением этого направления, как считает диссертант, может стать изучение возможности использования ПППД в качестве основы селективно-дифференциальных питательных сред для холерного вибриона, чумного микроба и других возбудителей опасных инфекционных болезней.

Перед отечественными производителями питательных сред стоят не менее важные задачи импортозамещения в области обеспечения функционирования автоматизи-

рованных систем (анализаторов, ферментеров и др.) в микробиологической промышленности.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации и дает представление о проделанной работе.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. По теме диссертации автором опубликована 31 научная работа, в том числе 14 – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденного ВАК Министерства образования и науки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени. Подготовлены в соавторстве два нормативно-методических документа федерального уровня, восемь комплектов нормативной и эксплуатационной документации на разработанные питательные среды. Получены три патента на изобретения.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на заседаниях Проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы»; на Совещании руководителей противочумных учреждений страны (Москва, 2013 г.); на расширенной коллегии Управления Роспотребнадзора по Ростовской области (Ростов-на-Дону, 2011 г.) и Совещаниях специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой (Ростов-на-Дону, 2011, 2013 гг.); на межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология)» (Ростов-на-Дону, 2015 г.).

Заключение. Диссертация Мазрухо Алексея Борисовича выполнена на высоком методическом уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, в основу которой положен анализ многолетних исследований большого актуального материала по разработке технологии изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей и конструирования на его основе питательных сред для культивирования и диагностики холерного вибриона и чумного микроба в результате личного участия автора. Диссертационная работа имеет теоретическое значение, содержит новые научные результаты и вносит существенный вклад в практику.

Материалы работы открывают перспективы дальнейших исследований в области микробиологии, биотехнологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций

– конструировании питательных сред для культивирования и идентификации возбудителей и внедрения их в практику. Особого внимания заслуживает возможность создания на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей универсальной питательной среды для холерного вибриона и чумного микроба.

В целом по своему содержанию и значимости, актуальности и новизне поставленных задач и проблем, методическому подходу к их разрешению, научно-практическому значению результатов диссертация Мазрухо Алексея Борисовича "Панкреатический перевар пекарских дрожжей – питательная основа сред для холерного вибриона и чумного микроба" соответствует критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв ведущей организации обсужден и одобрен на заседании ученого совета ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 2 от 6 февраля 2017 г.

Старший научный сотрудник лаборатории холеры Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека доктор медицинских наук Урбанович Людмила Яковлевна

Заведующий отделом питательных сред того же института кандидат биологических наук Кузнецов Владимир Ильич

Подписи доктора медицинских наук Л.Я. Урбанович и кандидата биологических наук В.И. Кузнецова заверяю

Начальник отдела кадров и специальной части института Шангареева Наталья Ильинична

664047, Иркутская область, г.Иркутск, ул.Трилиссера,д.78, тел. (3952) 22-01-35, факс (3952) 22-01-40, E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru