

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 25.02.2022 г. № 4
о присуждении Косиловой Ирине Сергеевне, гражданину РФ, ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите 20.12.2021 г., протокол № 32 диссертационным советом 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Косилова Ирина Сергеевна 1987 г. рождения, в 2010 г. окончила Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева по специальности «Биотехнология», работает младшим научным сотрудником в лаборатории разработки питательных сред Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории разработки питательных сред Федерального бюджетного учреждения науки «Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по

надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат химических наук (специальность 1.4.7. Высокмолекулярные соединения) Домотенко Любовь Викторовна, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория разработки питательных сред, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук (специальность 1.5.6. Биотехнология), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел экспериментальных фармацевтических форм, главный научный сотрудник,

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория кишечных инфекций, заведующая лабораторией,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь, в своем положительном заключении, подписанном Таран Татьяной Викторовной, доктор медицинских наук, лаборатория подготовки специалистов, заведующая лабораторией, указала, что диссертационная работа Косиловой Ирины Сергеевны «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» выполнена на актуальную тему, является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится

комплексное решение задачи конструирования отечественной питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, соответствующей международным стандартам качества. Диссертационная работа Косиловой Ирины Сергеевны «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Косилова Ирина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Соискатель имеет **26** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **26** работ, из них **3** статьи, опубликованных в рецензируемых изданиях, **1** патент на изобретение, **1** статья в других изданиях, **21** тезис в материалах международных и Всероссийских научных конференций. Общий объем работ – **4,9 п. л.**

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Шепелин, А.П. Оценка качества питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам / А.П. Шепелин, Т.П. Морозова, **И.С. Косилова**, Г.П. Глазкова, Л.В. Домотенко // **Дезинф. Антисепт.** – 2013. – Т.4, №1.– С.43–48. ВАК, ИФ РИНЦ = 0,156, Цит. = 5.

2. Домотенко, Л.В. Отечественный агар Мюллера-Хинтон: соответствие современным требованиям / Л.В. Домотенко, **И.С. Косилова**, А.П. Шепелин // **Инф. Иммуно.** – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 409–416. WoS Core, Scopus, ИФ РИНЦ = 0,751, Цит. = 3.

3. **Косилова, И.С.** Испытания питательной среды отечественного производства «Агар Мюллера-Хинтон II – Оболенск» / **И.С. Косилова**, Л.В. Домотенко, Н.К. Фурсова, С.В. Дентовская, М.Г. Ершова, А.П. Шепелин // **Клин. Лаб. Диагн.** – 2019. – Т. 64. – С. 360–367. Scopus, ИФ РИНЦ = 0,544, Цит. = 3.

4. Пат. RU № 2746624 Российская Федерация. Способ получения сухого солянокислотного гидролизата казеина / Домотенко Л.В., **Косилова И.С.**, Миронова Е.Н., Шепелин А.П. (RU); опубл.19.04.2021. – Бюл. № 11. – 17 с.

На диссертацию и автореферат поступило **4** положительных отзыва без замечаний от: **(1)** д-ра мед. наук, проф. **Харсеевой Галины Георгиевны**, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 Ростовского государственного медицинского университета Минздрава РФ, г. Ростов-на-Дону; **(2)** д-ра мед. наук, доцента **Малышева Владимира Васильевича**, заслуженного работника высшей школы РФ, профессора кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова Минобороны РФ, г. Санкт-Петербург; **(3)** канд. мед. наук **Сухоруковой Марии Витальевны**, врача-бактериолога лаборатории микробиологии и антимикробной терапии Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко Минздрава РФ, г. Москва; **(4)** д-ра биол. наук, проф. **Алешкина Андрея Владимировича**, зам. директора Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, г. Москва.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, профессор Комиссаров Александр Владимирович является признанным специалистом в сфере биотехнологии, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Косиловой И.С. (**Разраб. Регистр. Лекарств. Средств. – 2021. – Т. 3(10). – С. 115-130; 2020. – Т. 9(1). – С. 109-114; Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17(2). – С. 26-49; 2019. – Т. 15(4). – С. 32-40; 2018. – Т. 14(3). – С. 56-73; 2017. – Т. 13(3). – С. 65-70; Прикл. Хим. Биотехнол. – 2020. – Т. 10(3). – С. 506-514; Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2020. – № 4. – С. 6-15; 2020. – № 3. – С. 50-55; Инф. Иммуно. – 2018. – Т. 8(3). – С. 388-392; 2017. – № 6. – С. 244);**

доктор медицинских наук Кафтырева Лидия Алексеевна является признанным специалистом в сфере медицинской микробиологии, в частности - в области применения антимикробных препаратов, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Косиловой

И.С. (**Пробл. Мед. Микол.** – 2020. – Т. 22(4). – С. 54-59; 2020. – Т. 22(3). – С. 101; **Front. Microbiol.** – 2019. – V. 10. – P. 1755; 2019. – V. 10. – P. 2465; **Клин. Лаб. Диагн.** – 2020. – Т. 65(9). С. 557-561; 2020. – Т. 65(5). – С. 308-315; 2020. – Т. 65(4). – С. 251-257; 2019. – Т. 64(10). – С. 620-626; 2019. – Т. 64(6). – С. 368-375; **Инф. Иммуно.** – 2020. – Т.10(3). – С. 565-569; 2020. – Т. 10(1).– С. 99-110; 2018. – Т. 8(1). – С. 61-70; 2018. – Т. 8(3). – С. 349-354).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в сфере биотехнологии и разработки питательных сред, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Косиловой И.С. (**Пат. RU 2745504** С1, 25.03.2021; **RU 2748492** С1, 26.05.2021; **RU 2728379** С1, 29.07.2020; **RU 2708029** С1, 03.12.2019; **RU 2626568** С1, 28.07.2017; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2018. – № 1. – С.36-49; 2018. – № 3. – С.46-49; 2018. – № 4. – С.54-57; **Инф. Иммуно.** – 2018 – Т. 8(1). – С.85-90; 2017. – Т. 7(2). – С.203-208), а также наличием ученых, являющихся авторитетными специалистами по теме диссертации Косиловой И.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана технология производства солянокислотного гидролизата казеина и, на его основе, технология производства питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон);

предложен новый способ производства солянокислотного гидролизата казеина, отличающегося от коммерческих гидролизатов казеина сбалансированным составом ионов двухвалентных металлов и пониженным содержанием тимидина и обеспечивающий в составе питательной среды получение достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклину, тигециклину, карбапенемам и триметоприму/сульфаметоксазолу, который может быть положен в основу производства других белковых гидролизатов со сбалансированным составом ионов двухвалентных металлов и пониженным содержанием тимидина;

доказано, что использование разработанного солянокислотного гидролизата казеина со сбалансированным содержанием ионов двухвалентных металлов, а именно с содержанием кальция ($1,3\pm 0,15$) мг/г, магния – ($0,65\pm 0,05$) мг/г, марганца – не более 0,5 мг/г, цинка – не более 0,06 мг/г, и пониженным содержанием тимидина (менее 0,001 мг/г) обеспечивает получение питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон), удовлетворяющей требованиям международных стандартов (Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST), Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing — Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing»);

введены новые принципы организации биотехнологических процессов получения очищенного от ионов кальция, магния, марганца, цинка и тимидина солянокислотного гидролизата казеина, заключающиеся в гидролизе белка соляной кислотой с концентрацией от 1,8 N до 4,0 N при гидромодуле 1:5 и температуре (131 ± 2) °C в течение 2 ч; двухстадийной деионизации на анионообменной смоле до значений pH от 1,9 до 2,0 и от 3,5 до 4,5, обработке активированным углем в двух диапазонах pH для освобождения от тимидина при значении pH от 1,9 до 2,0 и для осветления при значении pH от 3,5 до 4,5, освобождении от ионов кальция, магния и марганца при значении pH от 8,5 до 9,0 и от ионов цинка при значении pH от 11,0 до 12,0.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: биотехнологических (гидролиз, деионизация на ионообменной смоле, высушивание, смешивание компонентов); микробиологических (оценка качества и сроков годности питательных сред, диско-диффузионный, градиентной диффузии (Е-тестов), СИМ-тест), молекулярно-биологических (полимеразная цепная реакция со специфичными праймерами), физико-химических (определение pH среды, содержания аминного азота и хлор-ионов, потери в массе при высушивании и прочности студня по Валенту, масс-

спектрометрия и атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой - для определения элементного состава гидролизатов и питательных сред, высокоэффективная эксклюзивная хроматография - для определения молекулярно-массового распределения пептидных фракций) и статистических методов (пакета программ MS-Excel, среднего арифметического вариационного ряда и стандартной ошибки ($M \pm m$), t-критерия Стьюдента, двустороннего критерия Фишера, уровня значимости $p < 0,05$);

доказано соответствие разработанной питательной среды – агар Мюллера-Хинтон международным стандартам качества при определении чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии (11187 и 702 проведенных тестов, соответственно) с использованием панели из 10 референс-штаммов микроорганизмов, рекомендованных стандартом Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам, и 165 клинических штаммов микроорганизмов;

изложены научно обоснованные рекомендации по получению солянокислотного гидролизата казеина с концентрацией ионов кальция от 1,15 мг/г до 1,45 мг/г, магния – от 0,6 мг/г до 0,7 мг/г, марганца – не более 0,5 мг/г, цинка – не более 0,06 мг/г, тимидина – менее 0,001 мг/г, на основе которого разработана питательная среда агар Мюллера-Хинтон для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, удовлетворяющая требованиям международных стандартов при определении чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, тигециклину, карбапенемам и сульфаниламидным препаратам диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии, и показана ее диагностическая ценность;

раскрыты особенности процесса получения солянокислотного гидролизата казеина, включающие: гидролиз белка соляной кислотой с концентрацией от 1,8 N до 4,0 N при гидромодуле 1:5 и температуре $(131 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 2 ч; двухстадийную деионизацию на анионообменной смоле до значений pH от 1,9 до 2,0 и от 3,5 до 4,5; обработку активированным углем в двух диапазонах pH для освобождения от тимидина при значении pH от 1,9 до

2,0, для осветления при значении рН от 3,5 до 4,5, для освобождения от ионов кальция, магния и марганца при значении рН от 8,5 до 9,0, от ионов цинка при значении рН от 11,0 до 12,0; распылительное высушивание;

изучены химические характеристики полученного солянокислотного гидролизата казеина: степень гидролиза от 70 % до 80 %; значение рН среды от 7,3 до 7,5; содержание аминного азота от 4,5 % до 6,5 %, хлор-ионов – от 19 % до 24 %, низкомолекулярных пептидных фракций с массой до 3 kD (90 %), свободных аминокислот ($40,1 \pm 2,7$) % и общих аминокислот ($54,7 \pm 2,5$) %;

проведено исследование по изучению чувствительности штаммов эмерджентного патогена, *Photorhabdus* spp. к антимикробным препаратам, в результате которого установлено влияние температур выращивания (25 ± 1) °С и (35 ± 1) °С на чувствительность *P. asymbiotica* US86, US88 и AU46 и *P. luminescens* НвТ к антибиотикам группы пенициллинов (ампициллину, бензилпенициллину и амоксициллину/клавулановой кислоте) и обосновано использование температуры (35 ± 1) °С для получения достоверных значений клинической категории чувствительности данных бактерий.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены Промышленный регламент ПР 78095326-12-2012 и Технические условия ТУ 9385-182-78095326-2012 на разработанный солянокислотный гидролизат казеина – федеральный уровень внедрения;

Технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015), Промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015) и Инструкция по применению на питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон) - федеральный уровень внедрения;

Питательная среда – агар Мюллера-Хинтон – зарегистрирована в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.). Выпущено 80 серий питательной среды, проведено более 3,5 млн. бактериологических исследований (Справка о внедрении результатов диссертационного исследования в производство на технологической базе ФБУН ГНЦ ПМБ от 20.09.2021 г.; Справка № 769 о внедрении результатов

диссертационной работы ГБУЗ Ярославская областная «Инфекционная клиническая больница» от 26.10.2021 г.) – федеральный уровень внедрения.

определены перспективы использования разработанных режимов получения солянокислотного гидролизата казеина для производства других белковых гидролизатов со сбалансированным содержанием ионов кальция, магния, марганца и цинка, а также пониженной концентрацией тимидина;

создана технологическая линия на базе ФБУН ГНЦ ПМБ по производству солянокислотного гидролизата казеина и питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон);

представлены методические рекомендации для получения новых белковых гидролизатов с заданными характеристиками по содержанию ионов двухвалентных металлов и тимидина.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты исследования получены в экспериментах с использованием сертифицированного оборудования и программного обеспечения, при этом применены современные методы микробиологии (диско-диффузионный метод, метод градиентной диффузии, Carbapenem Inactivation Method) и биотехнологии (гидролиз, деионизация), а также статистической обработки данных (пакет программ MS-Excel, двусторонний критерий Фишера);

идея диссертационного исследования базируется на анализе имеющихся в литературе данных отечественных и зарубежных исследователей, посвященных вопросам получения гидролизатов казеина, теоретическим основам механизмов действия антимикробных препаратов, определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам и влиянию качества питательной среды на результаты тестирования.

установлена частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными других авторов в части элементного состава питательной среды агар Мюллера-Хинтон различных фирм-производителей и его влияния на достоверность результатов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам;

использованы современные методы обработки данных с помощью пакета программ MS-Excel.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в разработке, испытаниях, подготовке нормативно-технической документации и внедрении в производство солянокислотного гидролизата казеина и питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера-Хинтон), в написании и представлении результатов в виде научных статей и докладов.

На заседании 25.02.2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Косиловой И.С. ученую степень кандидата биологических наук за комплексное решение актуальной задачи конструирования соответствующей международным стандартам качества отечественной питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, что имеет существенное значение для медицинской микробиологии и бактериологии).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **17** человек, из них **8** докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **17**, против **0**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н., доцент

(Хохлова Ольга Евгеньевна)

Дата оформления Заключения – 25.02.2022 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.