

ОТЗЫВ

Отзыв официального оппонента на диссертацию Косиловой Ирины Сергеевны «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы исследования

Во всех странах в алгоритм диагностического бактериологического исследования проб любого биологического материала на наличие бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний входит определение чувствительности к антибиотикам возбудителя. Результаты лабораторного исследования востребованы врачами клиницистами всех специальностей при назначении пациентам адекватной антимикробной терапии.

К числу глобальных вызовов, с которыми столкнулось человечество, относится резистентность к антибиотикам возбудителей инфекционных заболеваний, которая приняла масштабы глобальной «пандемии» и рассматривается в настоящее время как крупнейшая угроза национальной безопасности в каждой стране. В России резистентность возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к клинически значимым антибиотикам приблизилась к критическому уровню.

В 2011 г. была утверждена национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, одной из основных задач которой является повышение качества лабораторной диагностики и микробиологического мониторинга резистентных возбудителей, определение спектра устойчивости к антимикробным средствам (антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и др.). Особое внимание уделено качеству питательных сред, как основы для определения чувствительности, молекулярно–генетическому типированию возбудителей для слежения за циркуляцией международных эпидемических клонов на национальном уровне.

В 2004 г. на совещании экспертов ВОЗ, посвященном реализации

«Глобальной стратегии по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам», было предложено рассматривать феномен антибиотикорезистентности в бактериальных популяциях как новую инфекцию.

Осознавая рост резистентности к антибиотикам как угрозу национальной безопасности, многие страны разработали национальные программы по мониторингу резистентности/чувствительности возбудителей инфекционных заболеваний.

В России в 2017 г. была принята Стратегия предупреждения и распространения резистентности на период до 2030 г., в которой предусмотрено внедрение современных методов изучения механизмов ее формирования и мониторинга распространения. Единые стандартизированные методы определения чувствительности к антибиотикам и критерии интерпретации, основанные на современных знаниях о механизмах резистентности, позволят улучшить качество исследований и проводить эффективный мониторинг не только на местных, региональных и федеральных, но и международном уровнях.

В Российской Федерации проводят многочисленные научные исследования, результаты которых отражают ситуацию по распространению резистентности к антибиотикам различных микроорганизмов на территориях практически всех Федеральных округов. В отечественных журналах регулярно публикуют результаты многоцентровых микробиологических и эпидемиологических исследований о частоте встречаемости резистентных к антибиотикам широко распространенных микроорганизмов — возбудителей инфекций кровотока, мочевыводящих путей, инфекций кожи и мягких тканей, нозокомиальных пневмоний и др. Для определения чувствительности/резистентности диско-диффузионным методом, как правило, используют дорогие импортные питательные среды.

Современные стандартизированные отечественные среды для определения чувствительности к антибиотикам, соответствующие международным

стандартам, практически отсутствуют или производятся в малых количествах. Также отсутствуют данные по технологии производства солянокислотного гидролизата казеина с заданными стабильными характеристиками содержания ионов металлов и тимидина, от которого зависит качество питательной среды Мюллера-Хинтон.

Все выше сказанное определяет актуальность данной диссертационной работы по разработке технологии производства солянокислотного гидролизата казеина с заданными характеристиками содержания ионов металлов и концентрации тимидина и конструированию на его основе питательной среды (агар Мюллера-Хинтон) для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна результатов, выводов и рекомендаций диссертационной работы Косиловой Ирины Сергеевны определяется тем, что диссертантом впервые определены критерии качества солянокислотного гидролизата казеина – основного компонента питательной среды Мюллера-Хинтон. Используя в питательной среде солянокислотный гидролизат казеина с фиксированным сбалансированным содержанием ионов кальция, магния, марганца, цинка и концентрации тимидина, автор получила достоверные стабильные результаты при определении чувствительности широкого спектра микроорганизмов, являющихся на сегодняшний день актуальными возбудителями инфекционных заболеваний (нередко, вызывающих тяжелое течение заболевания у пациентов детского и взрослого возраста) к клинически значимым антимикробным препаратам шести функциональных групп (фторхинолонам, аминогликозидам, бета-лактамам (карбапенемам), тигециклину, тетрациклину и сульфаниламидам). Приоритет на способ получения солянокислотного гидролизата казеина подтвержден патентом RU № 2746624.

Другими словами, Косилова Ирина Сергеевна впервые в России разработала отечественную технологию производства солянокислотного гидролизата казеина со стабильно сбалансированным составом ионов металлов, на его основе сконструировала питательную среду для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (агар Мюллера-Хинтон), которая имеет важное значение в повышении качества лабораторных исследований в медицинской микробиологии и бактериологии, что, безусловно, скажется на качестве оказания медицинской помощи населению.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов обусловлена современными теоретическими положениями, основанными на глубоком анализе литературы, и определяется логически выстроенным планом исследования, в результате которого разработана технология производства солянокислотного гидролизата казеина с обоснованными характеристиками и сконструирована на его основе питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, удовлетворяющая требованиям международных стандартов.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечивается значительным объемом полученных данных, их соответствием поставленным целям и задачам, статистической обработкой полученных результатов. Выводы проведенных исследований экспериментально обоснованы и отражают цель и задачи диссертации.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость рецензируемой диссертационной работы заключается в том, что сконструированная отечественная питательная среда

Мюллера - Хинтон позволяет достоверно оценить наличие в популяциях возбудителей инфекционных заболеваний, циркулирующих на территории Российской Федерации, «чувствительных» и «резистентных» к антибиотикам клонов. На основе полученных данных эпидемиологи могут составить (оценить) прогнозы развития резистентности к конкретным антибиотикам и разработать противоэпидемические меры по ограничению циркуляции среди людей резистентных к антибиотикам возбудителей.

Использование сбалансированной отечественной питательной среды для определения чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных заболеваний позволит расширить диагностические и аналитические возможности лабораторных исследований, проводимых с целью оценки эпидемиологической значимости резистентных возбудителей в развитии эпидемического и инфекционного процессов на территории России.

Внедрение в практику здравоохранения качественной сбалансированной питательной среды Мюллера - Хинтон позволит получить достоверные представления о завозе и циркуляции на территории Российской Федерации международных клонов актуальных на сегодняшний день возбудителей, способных к широкому эпидемическому распространению.

Практическая значимость полученных результатов состоит в том, что применение разработанного способа получения солянокислотного гидролизата казеина может быть основой производства других белковых гидролизатов со сбалансированным содержанием ионов конкретных металлов и концентрации тимидина. На основе солянокислотного гидролизата казеина разработана отечественная питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (агар Мюллера – Хинтон), на которую утверждены Технические условия (ТУ 9385-227-78095326-2015), Промышленный регламент (ПР 78095326-150-2015) и Инструкция по применению. Питательная среда внедрена в производство на базе ФБУН ГНЦ ПМБ (справка о внедрении на федеральном уровне от 20.09.2021 г.). Разработанная питательная среда может быть эффективно

использована в клинической практике для выбора оптимального антибиотика при назначении антимикробной терапии пациентам с патологией различных органов и систем, при мониторинге резистентности/чувствительности возбудителей заболеваний в рамках эпидемиологического надзора за распространением резистентных клонов в объектах внешней среды на территории Российской Федерации.

Использование питательной среды на основе солянокислотного гидролизата казеина со сбалансированным содержанием ионов металлов расширяет возможности достоверного лабораторного подтверждения чувствительности к значительному перечню антибиотиков различных возбудителей инфекционных заболеваний, что, в целом, будет способствовать повышению качества оказания медицинской помощи населению в нашей стране.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Материалы диссертационной работы неоднократно доложены на научно - практических Всероссийских конференциях, в том числе с международным участием. Выводы работы отражены в 26 печатных работах, в том числе 3 - в изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, 22 - в сборниках материалов конференций. Получен 1 патент на изобретение.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа изложена на 149 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2) и трех глав собственных экспериментальных исследований, заключения, выводов, рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, списка публикаций автора по теме диссертации, списков рисунков и таблиц,

приложения. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 6 рисунками. Список литературы содержит 128 источников, из них более половины зарубежных. Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объеме представлены в автореферате и полностью соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата полностью отвечает существующим требованиям.

Во введении диссертантом раскрыты актуальность избранной темы исследования и показана степень ее разработанности, сформулирована цель и семь конкретных задач, решение которых необходимо для достижения поставленной цели. Представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость проведенного диссертационного исследования. Перед положениями, выносимыми на защиту, четко сформулирована методология и перечислены применяемые методы исследования, которые включали классические биотехнологические и современные молекулярно-биологические, а также статистические методы обработки полученных результатов. Методология исследования спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. В заключении введения перечислена апробация результатов исследования, личное участие автора в получении результатов, публикации по теме работы, объем и структура работы.

Первая глава **«Обзор литературы»** состоит из пяти разделов, содержание которых раскрывает актуальность избранной темы диссертационной работы. Диссертант приводит данные о том, что резистентность к антибиотикам в штаммах возбудителей различных инфекционных заболеваний в настоящее время приобрела глобальный характер и является важной проблемой в странах, расположенных на всех континентах, включая Российскую Федерацию; подробно излагает фенотипические и молекулярно-биологические методы, которые применяют в настоящее время для определения чувствительности/резистентности к

антибиотикам микроорганизмов. Отдельный раздел обзора литературы посвящен вопросам стандартизации диско-диффузионного метода, получившего широкое применение в мировой лабораторной практике с 1950-х гг., и в настоящее время является востребованным и основным методом, используемым во всех странах. Однако, в настоящее время с позиций доказательной медицины для получения достоверных результатов этот метод нуждается в стандартизации всех входящих в состав среды компонентов и всех этапов выполнения метода. Диссертант в обзоре литературы подробно останавливается на характеристике питательной среды Мюллера-Хинтон, основных компонентах, входящих в эту среду, которые могут влиять на конечный результат исследования. Диссертант, проанализировав данные литературы, справедливо приходит к заключению о необходимости стандартизировать, согласно требованиям международных стандартов, в первую очередь - состав питательного агара, как основы диско-диффузионного метода, от которого во многом зависит получение достоверных, воспроизводимых результатов исследования чувствительности/резистентности к антибиотикам штаммов возбудителей инфекционных заболеваний. Создание сбалансированного химического состава питательной среды, а также плотность, степень очистки и высота слоя агара в чашках Петри и др. влияет на конечный результат. Последний раздел обзора литературы посвящен основному компоненту среды Мюллера-Хинтон - солянокислотному гидролизату казеина, способам его получения и очистки с заданными характеристиками.

В целом, в главе «Обзор литературы» представлено современное состояние изучаемого диссертантом вопроса – качество питательной среды Мюллера-Хинтон и ее стандартизация.

В главе 2 «Материалы и методы» изложены методические приемы проведения исследования, основные материалы (сырье, для получения солянокислотного гидролизата казеина), компоненты питательной среды (от гидролизата казеина до солей двухвалентных металлов и др.) и питательные

агары различных производителей. Испытаны 183 штамма микроорганизмов (из коллекций АТСС и ГКПМ-Оболенск, российские штаммы возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи), а также диски с 55 антибиотиками (17 функциональных групп) производства Becton Dickinson и Е-тесты с 13 различными антибиотиками; изложены микробиологические, молекулярно-генетические и другие методы, клинические испытания питательной среды. Все перечисленное соответствует современному методическому уровню. Объем наблюдений и экспериментов достаточный, соответствует поставленным задачам.

Результаты собственных исследований изложены в 3 главах:

Глава 3: разработка технологии производства солянокислотного гидролизата казеина, который, в отличие от коммерческих гидролизатов, имеет сбалансированный состав ионов двухвалентных металлов (Ca, Mg, Mn, Zn), конкретное значение pH и пониженное содержание тимидина. Также изучены химические характеристики солянокислотного гидролизата казеина (степень гидролиза от 70 до 80 %, pH среды от 7,3 до 7,5) и др. По результатам данной главы подготовлена научно-техническая документация: Технические условия «Солянокислотный гидролизат казеина», ТУ 9385-182-78095326-2012 и Промышленный регламент «Солянокислотный гидролизат казеина» ПР 78095326-12-2012.

Глава 4: Разработка питательной среды (изучение ее физико-химических и биологических показателей качества) для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Диссертант, на основе разработанного солянокислотного гидролизата казеина, сконструировала питательную среду, обосновала ее чувствительность и основные физико-химические и биологические показатели качества, скорость роста микроорганизмов, используя за основу состав агара Мюллера-Хинтон.

На разработанном агаре Мюллера-Хинтон диско-диффузионном методом были получены воспроизводимые результаты: диаметры зон

подавления роста тест-штаммов микроорганизмов с обычными и со сложными питательными потребностями, в том числе, резистентные к антибиотикам с известными механизмами резистентности.

Контроль качества питательной среды был определен с использованием коллекции микроорганизмов, которая включала тест-штаммы, наиболее чувствительные к изменению содержания ионов двухвалентных металлов и тимидина.

Параллельно проведению экспериментальной части диссертационной работы был определен срок годности разработанной питательной среды, который составляет 2 года. Кроме того, с использованием метода «ускоренного старения», определен срок хранения разработанной питательной среды без ухудшения физико-химических и биологических показателей, который составил 24 месяца.

Глава 5: Результаты испытаний питательной среды (МХА-Оболенск) при определении чувствительности музейных и клинических штаммов микроорганизмов методами диско - диффузионным и градиентной диффузии (Е-тесты). Диссертант провела сравнительное изучение разработанной среды с аналогичными коммерческими питательными средами (семь сред) российского и зарубежного производства.

Среда, разработанная диссертантом, по результатам тестирования микроорганизмов (музейных, тест-штаммов АТСС и клинических изолятов) была на уровне известных импортных сред как при тестировании чувствительных к антибиотикам штаммов, так и резистентных, с известными механизмами резистентности (к 28 антибиотикам диско-диффузионным методом на МХА-Оболенск и МХА-BBL были получены совпадающие результаты в 99,6 %, а для карбапенем-резистентных штаммов – 100 % совпадение).

В Заключении диссертации автор тщательно и аргументировано анализирует и обсуждает полученные данные и еще раз подчеркивает, что разработанная питательная среда расширяет аналитические и диагностические

возможности достоверного отнесения изучаемого штамма к категории «чувствительный» или «резистентный». Заключение написано обстоятельно, критично и читается с интересом.

Выводы научно обоснованы, подтверждены достоверными результатами, полученными в процессе проведения диссертационной работы, являются логическим завершением научного исследования, соответствуют поставленным задачам и отражают сущность работы.

В **Приложении** приведено регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2017/5962 от 10 июля 2017 г. «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, сухая (агар Мюллера-Хинтон II)».

Соответствие специальности

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 1.5.6. Биотехнология.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний выполненная диссертационная работа не вызывает. В процессе ознакомления с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Для определения чувствительности дрожжей диско-диффузионным методом используют модифицированный агар Мюллера-Хинтон с добавлением глюкозы (0,4 мг/л) и метиленового синего (0,5 мкг/л). Можно ли использовать разработанную Вами среду для определения чувствительности грибов к лекарственным средствам?

2. Согласно EUCAST, при тестировании «фосфомицина» пограничные значения диаметров зон подавления роста установлены только для *E. coli*. Для

других представителей *Enterobacterales* и для *Staphylococcus* spp. необходимо определять МПК. В российских клинических рекомендациях среда для определения МПК должна содержать глюкозо-6-фосфат (в конечной концентрации 25 мг/л). Предлагаемая среда соответствует этим требованиям или Вы планируете выпускать специальную питательную среду для определения чувствительности штаммов *Enterobacterales* и *Staphylococcus* spp.? Этот вопрос относится и к даптомицину при определении чувствительности *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp. и анаэробов.

3. Европейские и Российские клинические рекомендации не рекомендуют определять чувствительность микроорганизмов диско-диффузионным методом к полимиксину, а регламентируют использовать метод последовательных разведений в бульоне. Вы планируете производить бульон Мюллера-Хинтон для метода микроразведений в бульоне специально для таких антибиотиков?

4. Планируете ли Вы выпускать готовую к употреблению среду (агар Мюллера-Хинтон), разлитую в чашки Петри, для определения чувствительности микроорганизмов с обычными и со сложными питательными потребностями?

5. Чем обусловлено повышенное внимание в Вашем исследовании к *Photorhabdus* ssp.? Идентифицируют ли этот микроорганизм в бактериологических лабораториях в нашей стране?

Замечания по рецензируемой работе отсутствуют, встречаются единичные опечатки: (антибиотик «пепфлоксацин» представлен как «перфлоксацин»); микроорганизм *Photorhabdus* входит в семейство *Morganellaceae* и в порядок *Enterobacterales*.

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Текст диссертации изложен четко, понятно, замечаний по оформлению работы нет.

Заключение

Диссертационная работа Косиловой Ирины Сергеевны на тему «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, является законченной научно-квалификационной работой, содержит новое решение актуальной научной задачи – создание сбалансированной отечественной питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, которая имеет важное значение для медицинской микробиологии и бактериологии.

По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа отвечает критериям пп. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426 и от 11.09.2021 г. № 1539, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Косилова Ирина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией кишечных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

доктор медицинских наук

Кафтырева Лидия Алексеевна

Подпись Л.А. Кафтыревой заверяю:

Ученый секретарь ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: 8 (812) 233-20-92, email: pasteur@pasteurorg.ru)

кандидат медицинских наук

Трифонова Галина Федоровна

02 февраля 2022 г.

