

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы.

Определение устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам (АМП) играет существенную роль при назначении антимикробной терапии пациентов. Не менее важно проведение данной процедуры в проведении эпиднадзора за антибиотикорезистентностью возбудителей инфекций.

Наиболее распространенным методом определения чувствительности микроорганизмов к АМП является диско-диффузионный метод, при проведении которого регуляторными органами рекомендовано использовать питательную среду – агар Мюллера-Хинтон. По данным Росздравнадзора в России зарегистрировано 21 медицинское изделие, в состав которого входит агар Мюллера-Хинтон, при этом лишь 6 производятся на российских производственных площадках. Международными стандартами определены требования к допустимым концентрациям ионов Mn^{2+} и Zn^{2+} , а также тимидина в агаре Мюллера-Хинтон. Также обсуждаются требования к содержанию ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Отсутствие данных по технологии приготовления солянокислотного гидролизата казеина (СГК), способного выступить основным компонентом агара Мюллера-Хинтон, определяет актуальность проведения исследований по разработке методических приемов его производства.

Соискатель совершенно справедливо отмечает, что актуальной проблемой является разработка стандартизированной питательной среды отечественного производства – агара Мюллера-Хинтон. Решение данной проблемы, которое представлено в диссертации Косиловой И.С., должно снизить импортозависимость страны и повысить качество исследований по определению устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Работа выполнена в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора в рамках двух НИР.

Цель диссертации определена ясно и направлена на разработку технологии производства солянокислотного гидролизата казеина с заданными характеристиками и

конструирование на его основе питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к АМП (агара Мюллера-Хинтон).

Задачи, сформулированные для решения поставленной цели, являются четкими, понятными и обеспечивают решение поставленной цели.

Научная новизна представленной для оппонирования работы состоит в том, что:

впервые определены критерии качества СГК, входящего в состав питательной среды, для получения достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, тигециклину, карбапенемам и к сульфаниламидам: содержание ионов Ca^{+2} от 1,15 мг/г до 1,45 мг/г, ионов Mg^{+2} от 0,6 мг/г до 0,7 мг/г, ионов Mn^{+2} не более 0,5 мг/г, ионов Zn^{+2} не более 0,06 мг/г, тимидина менее 0,001 мг/г. Приоритетность исследований на способ получения СГК подтверждена патентом РФ № 2746624;

с помощью разработанной питательной среды (агара Мюллера-Хинтон) систематически изучена чувствительность штаммов *Photorhabdus asymbiotica* и *Photorhabdus luminescens* к аминогликозидам, тетрациклинам, карбапенемам, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу, цефалоспорином, фторхинолонам, макролидам и пенициллинам. Выявлено влияние температуры выращивания (25 ± 1) °С и (35 ± 1) °С бактерий *Photorhabdus* spp. на чувствительность к антибиотикам группы пенициллинов (амоксициллину/клавулановой кислоте, ампициллину и бензилпенициллину) и обосновано использование температуры (35 ± 1) °С как оптимальной для определения их чувствительности к антимикробным препаратам.

Практическая значимость проведенных исследований подтверждается разработкой и внедрением в практику производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора документов федерального уровня внедрения на СГК (промышленный регламент ПР 78095326-12-2012 и технические условия ТУ 9385-182-78095326-2012) и питательную среду на основе СГК для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (промышленный регламент ПР 78095326-150-2015, технические условия ТУ 9385-227-78095326-2015 и Инструкция по применению). Дополнительным подтверждением практической значимости диссертации служит регистрация агара Мюллера-Хинтон в качестве медицинского изделия (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962 от 10.07.2017 г.).

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 3 глав 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.

Во **введении** автор представил актуальность темы исследования (хотя не выделил ее отдельным пунктом в отличие от автореферата) и степень ее разработанности, сформулировал цель и задачи диссертации, представил научную новизну, а также теоретическую и практическую значимость диссертации, сформулировал в чем состоит методология исследования, представил применяемые методы исследования, изложил положения выносимые на защиту. Также представлены данные по степени достоверности и апробации результатов работы, сведения о личном участии автора в получении результатов, публикациям по теме работы, структуре и объеме диссертации.

Обзор литературы (Глава 1), состоит из 5 подглав. В первой подглаве Косиловой И.С. приведены данные характеризующие проблему распространения микроорганизмов, устойчивых к АМП. Автором выявлено, что данная проблема носит глобальный характер, представляющей угрозу для здравоохранения во всем мире. Во второй подглаве диссертантом, исходя из цели работы, рассмотрены методы определения чувствительности микроорганизмов к АМП, при этом показаны их преимущества и недостатки. В третьей подглаве освещены вопросы стандартизации диско-диффузионного метода при определении устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам. Выявлена вариативность методических приемов постановки данного теста и определены параметры, влияющие на конечный результат. Четвертая подглава посвящена характеристике основных компонентов агара Мюллера-Хинтон. В результате был сделан обоснованный вывод о том, что для разработки питательной среды, используемой для определения чувствительности микроорганизмов к АМП, удовлетворяющей требованиям международных стандартов, необходимо использовать в ее составе СГК, очищенный от избыточного содержания в нем ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} и тимидина. Подглава 5 посвящена основному компоненту агара Мюллера-Хинтон – кислотному гидролизату казеина, а именно способам его получения и очистке. В результате анализа существующих методов очистки гидролизатов казеина был

сделан вывод, что основными их недостатками является отсутствие стадий осаждения ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} и освобождения от тимидина.

Обзор литературы занимает примерно 25 % объема диссертации и позволяет получить достаточно полное представление о современном состоянии изучаемого вопроса. К несомненным достоинствам обзора литературы следует отнести использование данных из «свежих» источников (из 128 наименований только 31 датированы до 2000 года).

В главе 2 «**Материалы и методы**» описаны основные материалы и условия проведения экспериментальных исследований. Используемые методические приемы соответствуют современному методическому уровню, являются широко апробированными, легко воспроизводимыми и надежными. Объем наблюдений, планирование и проведение экспериментов адекватны поставленным задачам, достаточны для доказательного статистического анализа.

Результаты исследований обобщены в 3 главах. В главе 3 представлены результаты экспериментов по разработке технологии производства СГК. Первоначально Косиловой И.С. были проведены эксперименты по конструированию агара Мюллера-Хинтон на основе коммерчески доступных гидролизатов казеина. Проведённые исследования показали, что питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к АМП не может быть изготовлена из коммерческих гидролизатов казеина из-за несбалансированного содержания ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , тимидина и некорректного значения рН. Результаты проведенных исследований послужили дополнительной мотивацией для разработки технологии производства СГК с определёнными физико-химическими показателями, сбалансированным содержанием ионов двухвалентных металлов и тимидина с целью использования его в качестве основы питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к АМП.

Далее автором обоснованы технологические приемы осаждения ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} , а также извлечения тимидина из СГК. Определены требования к содержанию тимидина, ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} в гидролизате казеина, которые составили менее 0,001 мг/г, (1,15-1,45) мг/г, (0,6-0,7) мг/г, не более 0,5 мг/г, и не более 0,06 мг/г соответственно. Также констатируется, что значение рН сухого СГК должно соответствовать интервалу от 7,3 до 7,5. По результатам исследований разработана технологическая схема производства СГК и представлено ее краткое описание.

В заключительной части исследований в рамках главы 3 изучены физико-химические свойства, элементный и аминокислотный состав СГК. Автором выявлено,

что элементный и аминокислотный состав практически тождественен казаминовым кислотам техническим.

Глава 4 посвящена разработке питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к АМП на основе СГК и изучению ее физико-химических и биологических характеристик. Автором обоснован качественно-количественный состав питательной среды, взяв за основу состав агара Мюллера-Хинтон. Проведенные исследования показали, что физико-химические показатели опытно-промышленных серий питательной среды значимо не отличаются друг от друга.

Экспериментальное определение значений диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с АМП (более 50 наименований) на опытно-промышленных сериях питательной среды выявило соответствие целевым значениям.

Кроме того, с использованием метода «ускоренного старения» определен срок хранения разработанной питательной среды без ухудшения биологических показателей, который составил 24 месяца.

Глава 5 посвящена исследованиям по испытанию разработанной питательной среды (МХА-Оболенск). Основные результаты были следующими:

выявлено, что не все коммерческие питательные среды (испытывались пять наименований импортных и три отечественных) сбалансированы по содержанию ионов двухвалентных металлов и тимидина, а из трех образцов отечественных питательных сред, используемых для определения чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом, только разработанная питательная среда (МХА-Оболенск) обеспечивает получение достоверных результатов определения чувствительности микроорганизмов к аминогликозидам, фторхинолонам и сульфаниламидным препаратам;

при тестировании музейных штаммов (использовали преимущественно *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* из-за их клинической значимости в качестве возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи и наличием нескольких генетических детерминант антибиотикорезистентности) к 28 АМП диско-диффузионным методом на МХА-Оболенск и МХА-BVL были в 99,6 % получены совпадающие результаты. Для 147 клинических изолятов обнаружено совпадение 99,7 %. При определении чувствительности музейных штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам методом градиентной диффузии (Е-тесты) данная величина составила 60,2 %;

при оценке карбапенемазной активности штаммов, несущих гены карбапенемаз несовпадений результатов, полученных на МХА-Оболensk и МХА-BBL, не зафиксировано; при определении чувствительности штаммов *Photorhabdus* spp. (нового возбудителя инфекционных болезней) к АМП диско-диффузионным методом выявлено, что результаты тестов необходимо интерпретировать в соответствии с таблицами, предназначенными для оценки чувствительности *Enterobacterales* к АМП, а также обосновано использование температуры (35±1) °С.

В **Заключении** диссертации последовательно и аргументировано сформулированы итоги исследований. **Выводы** соответствуют поставленным задачам и отражают сущность работы.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации, соответствует таковому в автореферате диссертации.

В **приложении** приведен основной документ, показывающий практическую значимость выполненной работы (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)»).

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность обеспечивается значительным объемом полученных экспериментальных данных, их соответствием теоретическим положениям, статистической обработкой данных экспериментов. Выводы из проведенных исследований теоретически и экспериментально обоснованы и отражают цель и задачи диссертации.

Диссертация написана четким и ясным языком, с использованием принятой терминологии, оформление диссертации существенных замечаний не вызывает.

Содержание диссертации в достаточной степени отражено в публикациях автора (в том числе в 3 статьях в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология), патенте РФ на изобретение, материал доложен на научных конференциях и известен научной общественности, а ее основные положения обстоятельно изложены в автореферате.

Автореферат диссертации, изложенный на 24 страницах, соответствует содержанию и основным итогам диссертации.

По содержанию диссертации имеются следующие **замечания и вопросы**:

1. Непонятно почему для оценки эффективности осаждения ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} применяли *P. aeruginosa* ATCC 27853 в комбинации с гентамицином, ионов Mn^{2+} – *E. coli* ATCC 25922 в комбинации с тигециклином, а ионов Zn^{2+} *P. aeruginosa* ATCC 27853 в комбинации с имипенемом (подраздел 3.2.3.1 и 3.2.3.2). Данный вопрос касается и исследований по очистке гидролизата казеина от тимидина – почему применялась *E. faecalis* ATCC 29212 в комбинации с триметопримом/сульфаметоксазолом?

2. В подразделе 3.2.3.3 «Определение требований к содержанию ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} в солянокислотном гидролизате казеина» не представлены экспериментальные данные, позволяющие сделать вывод о правильности установления оптимальных концентраций ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} . Данное замечание касается и подраздела 3.2.4 «Получение солянокислотного гидролизата казеина с определенным значением pH».

3. Непонятно каким образом рассчитывали элементный состав казеиновых кислот технических (таблица 3.12)?

4. Почему для конструирования питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к АМП на основе СГК использованы импортные (испанские) мясной экстракт и агар бактериологический? Насколько известно оппоненту, данные компоненты присутствуют в линейке производимых ГНЦ ПМБ питательных сред.

5. Отсутствует заключение по результатам исследований главы 5, что выглядит явным диссонансом в сравнении с другими главами.

6. К сожалению, в диссертации присутствуют отдельные неточности и пропуски. Так на странице 72 в слове «кислотных» пропущена буква «х», в списке литературы у источника под номером 86 нет года издания статьи, в автореферате в публикациях автора по теме диссертации у источника под номером 3 не указан номер журнала и т.д.

Необходимо отметить, что сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой, в результате проведенных исследований содержится решение научной задачи по созданию отечественной питательной среды, используемой в практике лечебно-профилактических учреждений здравоохранения Российской Федерации

по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, и имеющей существенное значение для обеспечения национальной безопасности в сфере здравоохранения и здоровья нации.

Полученные автором результаты достоверны, выводы являются четкими, аргументированными и обоснованными. Работа базируется на достаточном числе исходных данных. Она написана доходчиво, грамотно и аккуратно оформлена. Диссертационная работа «Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» отвечает критериям п. 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 № 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 кандидатским диссертациям, а ее автор Косилова Ирина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология.

Главный научный сотрудник отдела экспериментальных фармацевтических форм Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), доктор биологических наук, профессор

Адрес организации

410005, г. Саратов, ул. Университетская, д.46

Тел.: (8452) 26-21-31

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Подпись Комиссарова А.В. заверяю

Начальник отдела кадров

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

«11» 01 2022 г.

Комиссаров Александр
Владимирович



О.В. Шумигай