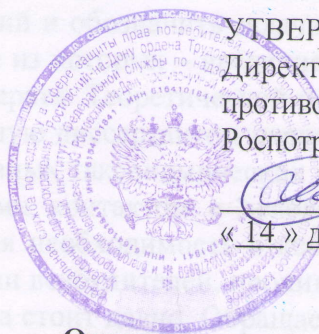




Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
**Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ростовский -на- Дону  
ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека**  
(ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)  
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40  
Тел. (863) 240-27-03, Факс: (863) 267-02-23, E-mail: plague@aaanet.ru, Сайт: http://antiplague.ru  
ОКПО 01898316, ОГРН 1026103278959, ИНН 6164101841, КПП 616401001



УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФКУЗ Ростовский-на-Дону  
противочумный институт  
Роспотребнадзора,  
С.В. Титова  
« 14 » декабря 2017 г.

#### Отзыв

**ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы  
Подкопаева Ярослава Васильевича «Разработка питательных сред для выделения и  
культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов», представленной  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям  
03.02.03-микробиология, 03.01.06-биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Актуальность темы исследования.** Бактериальные гнойные менингиты занимают одно из ведущих мест в структуре нейроинфекций: заболеваемость ими находится в пределах 5-10 на 100 тыс. населения. Актуальность данной инфекционной патологии обусловлена тяжестью течения гнойных менингитов, высоким риском развития различных осложнений, в том числе угрожающих жизни в остром периоде заболевания и формированием стойких резидуальных последствий у выживших больных (Пилипенко В.В. с соавт., 2011). Несмотря на наличие большого выбора антибактериальных препаратов летальность от этой группы заболеваний на протяжении последних 40-50 лет не снижается и остается в следующих пределах: 15-50% при пневмококковом менингите, 5-15% - при менингококковой инфекции, 3-20% - при гемофильном менингите.

Бактериологический метод исследования при гнойных бактериальных менингитах является одним из ведущих методов лабораторной диагностики этой группы заболеваний, так как позволяет достоверно подтвердить наличие возбудителя.

Этиологические агенты ГБМ *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *N. meningitidis* очень требовательны к питательному субстрату, полноценный рост обеспечивается при добавке к средам культивирования сыворотки, крови и иных вегетирующих добавок.

Наиболее распространенными средами для выделения и культивирования возбудителей ГБМ являются шоколадный, кровяной и сывороточный агары, приготовленные на основе агара Хоттингера, триптиказо-соевого агара, сердечно-мозгового агара, колумбийского агара, агара для бруцелл. В качестве питательных основ таких сред в разные годы были предложены панкреатический гидролизат казеина, пептический перевар животных тканей, а в качестве источника стимуляторов роста – дрожжевой экстракт, мясной экстракт, никотинамид, гемин, дефибринированная кровь ба-



рана, лошади, кровь и сыворотка крупного рогатого скота. Данные среды состоят, преимущественно, из сырья и ростовых добавок животного происхождения и, следовательно, достаточно трудно стандартизируются. Применение полусинтетических и синтетических сред для культивирования бактерий – возбудителей ГБМ ограничено, с одной стороны, дороговизной входящих в их состав ингредиентов (аминокислот, нуклеотидов, витаминов), с другой – различиями в питательных потребностях штаммов. Большинство из сред, используемых для выделения и культивирования возбудителей ГБМ, является средами лабораторного изготовления, которым в настоящее время нет промышленных аналогов. В связи с этим, цель, поставленная Подкопаевым Ярославом Васильевичем, – создание новых питательных сред для возбудителей гнойных бактериальных менингитов – актуальна.

**Оценка содержания диссертации, её завершённость в целом.** Диссертационная работа Подкопаева Я.В. «Разработка питательных сред для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов» написана в традиционном формате и содержит 5 глав, из которых первая – обзор литературы. Изучение большого количества научных источников позволило автору монографии оценить достижения и недостатки отечественной и зарубежной микробиологии в избранной им области исследований и обозначить задачи, решение которых обеспечит ему достижение поставленной цели, главные из которых – введение в среды новых ростовых и селективных добавок и создание сухого препарата. Теоретической основой экспериментальной работы на первом этапе можно считать осознанную диссертантом парадигму, согласно которой, несмотря на метаболические отличия бактерий разных таксономических групп, их представители обладают общими потребностями, обусловленными контактом с человеческим организмом. В случае с гнойными менингитами – это жизненная необходимость в компонентах крови. Кровяные агары нередко используют при культивировании возбудителей, проникающих в кровь, и вопрос о замене такого дефицитного сырьевого источника стоит давно. Обращает на себя внимание высокий методический уровень исследовательской работы Я.В. Подкопаева. Экспериментальные материалы получены на основе опытов с 14 штаммами следующих типов: *Haemophilus influenzae* типа а, типа в и неинкапсулированного; *Nisseria meningitidis* серотипа а, серотипа в и серотипа с; *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3, серотипа 5 и серотипа 19F. В качестве контрольных и дополнительных сред сравнивали с регламентированными отечественными образцами и коммерческими зарубежными средами производства фирмы Oxoid, Becton Dickinson, bioMerieux, HiMedia. Среди методических приёмов, которые сыграли не последнюю роль в исследованиях соискателя, следует отметить метод электронной микроскопии с изучением ультратонких срезов микробных клеток и кондуктометрический метод с применением микробиологического анализатора «Бак Трак» 4100 с программным обеспечением. Анализ результатов с помощью статистических методов даёт возможность удостовериться в правомерности выводов, сделанных автором в итоге проделанной работы.

Большой объём экспериментальных исследований с использованием перечисленных и других микробиологических и биохимических методов сделал возможным сконструировать питательную среду для выделения и культивирования *H. influenzae* (Гемофилус агар), а для выделения культур *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* – Шоколадный агар и ГБМ-агар. Это позволило исследователю вынести на защиту положения, связанные с возможностью практического применения, перспективностью названных препаратов. Со своей стороны, мы хотим подчеркнуть новизну способа достижения такого результата: впервые в качестве заменителя нативной крови или гемоглобина применён иной стимулятор роста.

Заслуживает похвалы экспериментальная работа по конструированию питательной основы, пригодной для выращивания возбудителей ГБМ. Анализ выпускаемых ФБУН ГНЦ ПМБ белковых гидролизатов показал возможность использования их для этой цели. Окончательный выбор пал на панкреатический перевар казеина. Однако исследователей не удовлетворяли некоторые биологические показатели, поэтому для повышения скорости роста и чувствительности сред, предназначенных для культивирования изучаемых штаммов, диссертант внёс в окончательную рецептуру основы дрожжевой экстракт (ЭПД), пептон и гидролизат казеина (ПГК) в подобранных концен-



трациях. Для этого с помощью кондуктометрического анализатора изучалась динамика метаболической активности бактерий. Статистически значимое улучшение ростовых свойств *H. influenzae* и *N. meningitidis* имело место при обогащении ПГК пептоном и экстрактом пекарских дрожжей, но существенного влияния не отмечалось в опытах с *S. pneumoniae*. Это коррелировало с результатами, полученными методом посева на плотные питательные среды. Здесь следует отметить, что влияние пептона и дрожжевого экстракта некоторых серий было равноценно; в других случаях имелись различия, объясняемые неодинаковыми концентрациями пиридиннуклеотидов – фактора V, необходимого для роста *H. influenzae*. Имели место колебания значений pH, что привело к введению в окончательный состав сред стабилизирующих компонентов. В среду Гемофилус-агар был введён никотинамиддинуклеотид, а также ферментативный гидролизат чёрного альбумина СРГМ, заменитель нативной крови, используемой ранее как источник ростового фактора X. Для ингибирования микробов – ассоциантов добавили бацитрацин.

Представленные здесь опыты и состав среды для выращивания гемофильной бактерии послужили базой дальнейшей работы Я.В. Подкопаева. Было установлено, что главными компонентами сред для культивирования основных возбудителей ГБМ остаются гидролизат казеина, пептон и дрожжевой автолизат, а при обогащении питательной среды следует исходить из необходимости в этом. Примером тому служат результаты изучения влияния замены кристаллического гемина новым стимулятором роста. Он улучшал ростовые свойства *H. influenzae* и *N. meningitidis*, но являлся дифференцирующим компонентом при культивировании *S. pneumoniae*. При разработке прописей сред для выделения всех трёх видов бактерий автор диссертации представляет ГБМ-агар и Шоколадный агар. Для целей селективного отбора он разработал три различных добавки (СД-Г, СД-П, СД-М), специфическая активность которых была подтверждена в реакции латекс-агглютинации. Помимо этого, выделенные штаммы исследовали методами ПЦР с аналогичным результатом. В итоге окончания первой части своих исследований Я.В. Подкопаев создал три экспериментальные среды: для выделения и культивирования *H. influenzae*, а затем - для выделения *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*. По предварительным данным автора, существует перспектива их промышленного выпуска.

Второй частью диссертационной работы можно считать решение вопросов производства, которые представлены в главе 4 под названием «Разработка технологии производства питательных сред». На этом этапе исследования изучались возможности серийного выпуска Гемофилус агара, Шоколадного агара и ГБМ-агара. Формы изготовления каждого препарата были выбраны в соответствии с особенностями компонентов среды. Выпуск в виде сухой питательной среды посчитали более приемлемым для ГБМ-агара. Гемофильный агар и Шоколадный агар решили выпускать во флаконах с последующим расплавлением и розливом в чашки Петри. Поскольку технология производства питательных основ и добавок к ним разные, решение задач по производству каждой из сред представлено в отдельных подразделах диссертации. Автор обращал внимание на все возможные трудности, среди которых числилась стерилизация отдельных компонентов, и преодолел их благодаря использованию современных приёмов биотехнологии. Среда, технические условия изготовления которых были отработаны, подвергались всестороннему контролю.

Глава 5 диссертации посвящена оценке качества производственных серий разработанных питательных сред. При выполнении данного раздела коммерческие препараты были представлены многочисленными импортными образцами шоколадных агаров с различными добавками. В результате опытов сравнения исследователи пришли к выводу, что характер роста разнообразных возбудителей ГБМ на Гемофилус агаре и Шоколадном агаре 10 серий выпуска не отличался от такового при культивировании на средах производства французской, индийской, английской и американской фирм.

В диссертации также представлены исследования клинического материала – девяноста образцов мазков из зева больных с контролями десяти проб от здоровых людей. При посевах на экспериментальные среды наибольшее количество выделенных культур принадлежало роду *Streptococcus*. С пластинок Гемофилус агара и Шоколадного агара было изолировано 23 культуры *S. pneumoniae*. ГБМ-агар в большей степени способствовал росту представителей рода *Haemophilus*. Использование селективного варианта позволяло значительно уменьшить количество колоний



сателлитов и облегчить выделение патогенных бактерий. Стимулятор роста *H. influenzae* послужил полной заменой кристаллического гемина и придал питательным средам дифференцирующие свойства, в результате чего выделили 9 штаммов гемофильных бактерий.

Конечным результатом экспериментальной части диссертации Я.В. Подкопаева можно считать определение сроков хранения изготовленных препаратов. Срок годности ГБМ-агара выявляли методом «ускоренного старения» пяти серий сухой основы. С помощью соответствующей математической формулы высчитана возможная длительность хранения препарата, равная 28 месяцам.

**Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.** Подводя итог анализу материалов, представленных соискателем в диссертационной работе, отметим основные результаты его исследований и их значимость.

1. Разработаны три готовых к применению питательных среды для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных инфекций, одна из которых - сухая. Технология их изготовления позволяет видеть перспективу их промышленного производства.

2. Впервые в качестве заменителя крови в среде для культивирования *H. influenzae* использован стимулятор роста гемофильной бактерии. Этот же стимулятор придаёт среде дифференцирующие свойства при выращивании пневмококка.

3. Доказана диагностическая ценность сред, в том числе при лабораторном исследовании клинического материала.

4. Все три питательные среды зарегистрированы как медицинские изделия в установленном в Российской Федерации порядке.

Научная новизна полученных автором диссертации результатов определяется выявлением влияния состава определённых компонентов питательных сред на рост бактерий. В этой связи при создании новых сред или применении новых препаратов настоятельно необходимы знания их физико-химических показателей. Эксперименты Я.В. Подкопаева в поисках заменителя крови являются тому убедительной иллюстрацией.

Что же касается практической значимости диссертационной работы, то бесспорным доказательством её можно считать создание технологии промышленного производства новых сред.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.** Высокий профессиональный уровень экспериментальной работы с использованием самых передовых методических подходов, множество контролей и глубокий анализ результатов опытов являются серьёзным основанием считать достоверной всю информацию, предложенную автором для ознакомления специалистов, в том числе в виде публикаций.

**Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.** Основные результаты, представленные в диссертации, были доложены на Междисциплинарной конференции СКФО (Железноводск, 2013), Всероссийской научно-практической конференции по вопросам воздушно-капельных инфекций (Ростов-на-Дону, 2014), I-ом Национальном конгрессе бактериологов (Москва, 2015), VIII-ой Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных (Московская обл., 2016). Обсуждение полученных Я.В. Подкопаевым экспериментальных данных дало возможность публикации 14 печатных изданий, среди которых 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Помимо этого, опубликован 1 патент на изобретение и 1 методические рекомендации.

#### **Заключение.**

Диссертация Подкопаева Ярослава Васильевича «Разработка питательных сред для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов» выполнена на высоком методическом уровне и является законченной научной работой, в основу которой положен анализ многолетних исследований, проводимых при непосредственном участии автора. Диссертация имеет теоретическое и практическое значение, содержит новые результаты и вносит вклад в медицинскую лабораторную работу. Представленные в ней материалы открывают перспективу в конструировании питательных сред с внедрением их в производство.

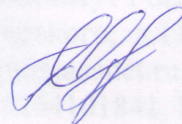
По содержанию, новизне и значимости диссертация Подкопаева Ярослава Васильевича «Разработка питательных сред для выделения и культивирования возбудителей гнойных бактериальных менингитов» соответствует критериям «Положения о порядке присуждения учёных степе-



ней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03-микробиология, 03.01.06-биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

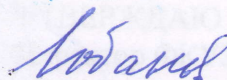
Отзыв ведущей организации обсуждён и одобрен на заседании учёного совета ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (Протокол № 12 от 14 декабря 2017 г.).

Заведующий лабораторией  
питательных сред ФКУЗ Ростовский-на-Дону  
противочумный институт Роспотребнадзора,  
кандидат медицинских наук



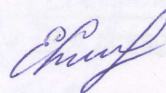
Мазрухо А.Б.

Старший научный сотрудник  
лаборатории питательных сред ФКУЗ Ростовский-на-Дону  
противочумный институт Роспотребнадзора,  
доктор медицинских наук



Лобанов В.В.

Подписи заверяю:  
Начальник отдела кадров  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный  
институт Роспотребнадзора



Стоян Е.Е.

