

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича на диссертационную работу Змеевой Татьяны Алексеевны на тему: «Повышение эффективности методов санитарно-микробиологических исследований воды с использованием современных мембранных технологий и способов детекции», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Актуальность темы исследования. Проблема безопасного в эпидемиологическом отношении водопользования населения является одной из важнейших задач в системе санитарно-эпидемиологического надзора. Актуальность темы исследования связана с нарастающим влиянием антропогенных факторов контаминации водных объектов окружающей среды возбудителями кишечных инфекций. Водным путем могут передаваться патогенные микроорганизмы, вызывающие кишечные инфекции, такие как: брюшной тиф и паратифы, сальмонеллез, дизентерия, вирусный гепатит А, полиомиелит и др. Каждый десятый житель планеты ежегодно страдает от заболеваний, связанных с употреблением воды неудовлетворительного качества.

Имеются определенные трудности в обеспечении безопасной питьевой водой военнослужащих различных силовых структур Российской Федерации. Связанные с водным фактором инфекционные заболевания приводят к отрыву личного состава от боевой подготовки, выполнения специальных задач в регионах с различными климатическими условиями, в экстремальных ситуациях (землетрясения, наводнения, катастрофы и прочее), при выполнении миротворческих миссий по ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций, как в мирное время, так и при участии в локальных вооруженных конфликтах. При этом большое значение имеет разработка и использование достоверных методов контроля качества воды. Для оценки

качества воды в стационарных и полевых условиях приобретают особую актуальность методы экспрессной оценки микробиологической безопасности воды.

В практике санитарно-микробиологического контроля воды наиболее широко применяется метод мембранной пробоподготовки. При этом появление новых фильтрующих материалов для использования в качестве фильтров требует постоянного обновления информации об их эффективности. Кроме этого, постоянно совершенствуются и методы детекции санитарно-показательных микроорганизмов в воде, что требует дополнительного изучения этого вопроса.

В связи с вышеизложенным тема и цель диссертационной работы Змеевой Т.А. являются весьма актуальными и обоснованными.

Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Проведены экспериментальные исследования и изучена эффективность извлечения *Escherichia coli* из воды бактериологическим посевом методом мембранной фильтрации у широкого спектра современных фильтрующих мембран с диаметром пор 0,45 мкм и 0,2 мкм из различных материалов (ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, смеси сложных эфиров целлюлозы, полиамида). Получены данные о меньшей эффективности извлечения *E.coli* фильтрующими мембранами из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром 0,2 мкм, по сравнению с мембранами со средним диаметром 0,45 мкм. В исследовании показано изменение типичных свойств *E.coli* на микрофильтрационных полиамидных мембранах при инкубации на среде Эндо, затрудняющее подсчет колоний на поверхности фильтра и искажающую показатели истинного качества воды.

Автором научно обоснованы преимущества вакуумной фильтрации воды по сравнению с напорной фильтрацией при концентрировании ротавирусов из воды, достоверность исследований подтверждается использованием современных специфических методов детекции ротавирусных маркеров:

полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), метод иммуноферментного анализа (ИФА) и более простые – метод иммунохроматографического анализа (ИХА) и реакция агглютинации латекса (РАЛ).

На основе полученных результатов разработан макет комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных бактерий и вирусов в воде, включающий установку для проведения микробиологического анализа водных сред (получено уведомление о положительном результате формальной экспертизы заявки на изобретение) и установку для концентрирования ротавирусов и бактериофагов из природных водных источников (получено решение о выдаче патента на полезную модель). В основу разработки макета комплекта была заложена идея использования мобильного, малогабаритного оборудования для обнаружения кишечных микроорганизмов на месте отбора проб при проведении санитарно-бактериологического и санитарно-вирусологического контроля водных объектов.

Поставленные автором цель и задачи исследования успешно выполнены. Результаты исследования обладают высокой степенью научной новизны и позволили автору обосновать научные положения, выводы, дать рекомендации. Так, исследования полиморфизма *E. coli* на поверхности разных микрофильтрационных материалов позволили автору, из отобранных, различных по составу мембранных фильтров, с разным диаметром пор, выбрать наиболее эффективные для обнаружения и подсчета кишечной палочки в пробах воды. Использование экспериментальных капроновых мембран с положительным зарядом в режиме вакуумной фильтрации вирусных модельных водоемов, позволили увеличить концентрацию ротавирусов в полученных элюатах и провести детекцию ротавирусных маркеров экспресс-тестами (метод иммунохроматографического анализа и реакция агглютинации латекса).

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в том, что удалось повысить эффективность

метода мембранной фильтрации в санитарно-микробиологических исследованиях воды за счет изучения традиционных и инновационных фильтрационных материалов, при этом была доказана целесообразность применения вакуумного режима пробоподготовки воды при определении бактериологических и вирусологических показателей.

Убедительно показано, что использование фильтрующих мембран из полиамида с диаметром пор 0,2 мкм для извлечения *E. coli* из воды при бактериологическом посеве методом мембранной фильтрации и инкубации на среде Эндо дает ложноотрицательные результаты.

Использование для концентрирования ротавирусов из воды экспериментальных микрофильтрационных мембран из капрона с положительным зарядом в режиме вакуумной фильтрации позволило получить их концентрацию большую, чем при использовании известных в практике фильтрующих мембран из полиамида, на порядок, в результате чего увеличилась разрешающая способность мембранного метода концентрирования ротавирусов и их маркеров, и проведена эффективная детекция ротавирусных антигенов в элюатах методами ИХА и РАЛ. При этом проводилась специфическая верификация полученных результатов.

Практическая значимость работы заключается в том, что использование для пробоподготовки воды наиболее эффективных мембран и экспрессных методов исследования проб на выявление кишечной палочки и ротавирусов позволили разработать концепцию и создать макет комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных микроорганизмов в воде. С помощью такого комплекта возможно проведение оценки безопасности водопользования населения, военнослужащих Вооружённых сил Российской Федерации, других силовых структур в экстремальных ситуациях, в полевых условиях и удаленных от стационарных лабораторий местностях, с достаточной эффективностью и низкими экономическими затратами.

Материалы исследований реализованы в следующих документах: учебном пособии «Использование мембранных технологий в санитарной

микробиологии» (в соответствии с Планом редакционно-издательской деятельности ГВМУ МО РФ на 2016 г. от 31.12.2015г.), в разделе проекта методических рекомендаций по инновационной пробоподготовке воды для выявления бактериальных и вирусных патогенов с помощью фильтрационных мембранных технологий и методов детекции.

Основные положения диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедрах: микробиологии; общей и военной эпидемиологии; общей и военной гигиены (с курсом военно-морской и радиационной гигиены) федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (акт внедрения от 14.07.2017 г.). Предложенные методики по подсчету *E. coli* и экспресс-детекции маркеров (антигенов) возбудителей острых кишечных вирусных инфекций в пробах воды внедрены в повседневную работу ФГКУ «985 ЦГСЭН» Минобороны России (акт внедрения от 22.02.2017 г.), в практику работы Центра исследования воды МУП города Череповца «Водоканал» (акт внедрения от 17.02.2017 г.) и Санкт-Петербургского научно-исследовательского центра экологической безопасности Российской академии наук (акт внедрения от 20.03.2017 г.).

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях. Диссертационное исследование, выполненное Змеевой Т.А. носит научно-прикладной характер. Достоверность полученных результатов исследования не вызывает сомнения, результаты подтверждены большим объемом материалов исследований и статистической обработкой с использованием программного обеспечения. Положения основаны на результатах, полученных с использованием современных микробиологических методов исследования, и знании современной литературы. Использован классический бактериологический посев методом мембранной фильтрации для извлечения *Escherichia coli* из воды. После пробоподготовки микрофильтрационными мембранами модельных водоемов,

содержащих ротавирусы, в полученных элюатах автор определяла РНК ротавирусов методом полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции; для определения ротавирусных антигенов использовала метод иммуноферментного анализа и экспресс-тесты – метод иммунохроматографического анализа и реакция агглютинации латекса. Кроме того, проведена электронная микроскопия вирусных модельных водоемов и элюатов для подтверждения наличия ротавирусов. Основные этапы работы представлены и обсуждены на Всероссийских и международных конференциях. По материалам работы автором опубликовано 10 печатных работ, из них 7 тезисов и 3 статьи, которые изданы в рецензируемых изданиях. Результаты диссертации активно используются и внедрены в учебный процесс Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации.

Структура диссертационной работы Змеевой Т.А. соответствует ГОСТ Р 7.0.11-2011. Диссертация изложена на 134 страницах печатного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, основной части – глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 31 рисунком. Список литературы включает 103 отечественных и 57 иностранных публикаций.

Во введении представлены сведения об актуальности и степени разработанности темы исследования, сформулированы цель и задачи, обобщены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Автор излагает методологию и методы собственных исследований, основные положения, выносимые на защиту. Материалы и методы дают полное представление об объеме исследований, а использование современных микробиологических методов свидетельствует о высоком методическом уровне работы.

В обзоре литературы проанализирован достаточный объем информации

о методах санитарно-бактериологического и санитарно-вирусологического исследования воды методом мембранной фильтрации. Проведен анализ литературных данных о фильтрующих мембранах, изготовленных из различных материалов, которые используются для извлечения бактерий и концентрирования вирусов из воды в отечественной и мировой микробиологической практике с различными результатами эффективности. Данные литературы используются при обсуждении полученных результатов. Обзор написан логично и читается с интересом.

Результаты собственных исследований подробно представлены в трёх главах. Во второй главе собственных исследований проанализированы данные эффективности фильтрующих материалов, синтезированных из различных материалов, с разным диаметром пор при извлечении *E. coli* из воды, методами вакуумной и напорной фильтрации. Исследована эффективность концентрирования ротавирусов в режимах вакуумной и напорной фильтрации в воде с использованием разных микрофильтрационных мембран, в том числе капроновых мембран с положительным зарядом.

Показано, что при проведении санитарно-микробиологических исследований воды для обнаружения и количественного учета колиформных бактерий и *E. coli* с помощью бактериологического посева методом мембранной фильтрации аналитически более эффективны мембраны из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним размером пор 0,45 мкм, из имеющихся эфирцеллюлозных материалов с различным диаметром пор (0,2 мкм и 0,45 мкм) и других.

Получена наибольшая концентрация ротавирусов из воды с помощью экспериментальных капроновых мембран с положительным зарядом и диаметром пор 0,2 мкм в режиме вакуумной фильтрации. Установлена наибольшая эффективность концентрирования ротавирусов при вакуумной мембранной фильтрации, чем при напорной фильтрации, с использованием микробиологических методов (ОТ-ПЦР, ИФА, ИХА, РАЛ) определения ротавирусных маркеров.

В следующей главе автором представлены результаты практического использования наиболее эффективных фильтров при проведении комплексной оценки качества воды поверхностного водоисточника с исследованием проб на различные показатели (*E. coli*, колиформные бактерии, сальмонеллы, маркеры ротавирусов и вируса гепатита А, колифаги). Оценка полученных данных позволила автору установить вирусную контаминацию в большем количестве проб по сравнению со среднемноголетними исследованиями проб воды. Используемые таблицы и рисунки позволяют легко воспринимать текст.

Практическим применением наиболее эффективных микрофильтрационных мембран для извлечения *E. coli* и концентрирования ротавирусов в режиме вакуумной фильтрации при пробоподготовке воды, а также экспресс-тестов (ИХА, РАЛ) для детекции ротавирусных антигенов стала разработка отдельных элементов мобильного, малогабаритного оборудования для обнаружения кишечных микроорганизмов на месте отбора проб при проведении санитарно-бактериологического и санитарно-вирусологического контроля водных объектов.

Диссертация изложена научным языком. Анализ и обсуждение полученных результатов диссертационного исследования приведены в разделе «Заключение», который представляет собой обобщающее изложение основополагающих моментов диссертации. Выводы и положения подтверждены полученными результатами. Выводы работы соответствуют поставленным в начале работы задачам и отражают содержание диссертационного исследования, что позволяет считать основную цель достигнутой.

Автореферат соответствует содержанию, основным результатам и выводам диссертационной работы.

Соответствие специальности. Работа представляет собой целостное законченное научное исследование и соответствует специальности 03.02.03 – микробиология.

Достоинства работы:

1. Показана возможность использования экономичных экспресс-тестов в санитарно-микробиологических исследованиях воды.

2. Предложенный макет комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных микроорганизмов в воде даст возможность исследовать водные объекты с определением колиформных бактерий и детекцией вирусных маркеров (антигенов) на месте отбора проб, в полевых условиях и различных экстремальных ситуациях и с необходимой кратностью исследований.

Принципиальных замечаний у нас не возникло, однако при изучении диссертации возникли вопросы:

1. При проведении лабораторных исследований использовались диагностикумы и тест-системы отечественных или зарубежных производителей?

2. Что представляет собой диагностикум для определения ротавирусного антигена в реакции агглютинации латекса?

3. Как Вы можете объяснить, что при прохождении *E.coli* через фильтр из полиамида со средним диаметром пор 0,2 мкм колонии росли в R-форме и у них снижалась ферментативная активность?

Заключение. Диссертационная работа Змеевой Татьяны Алексеевны на тему: «Повышение эффективности методов санитарно-микробиологических исследований воды с использованием современных мембранных технологий и способов детекции» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук Малышева Владимира Васильевича, содержит новое решение актуальной научно-практической задачи – повышение качества оценки воды на основе совершенствования эффективности метода мембранной фильтрации при санитарно-микробиологических исследованиях воды за счет использования наиболее эффективных фильтрующих мембран, увеличения разрешающей способности методов детекции, а также возможности получения предварительного результата исследования на месте отбора проб, в полевых условиях.

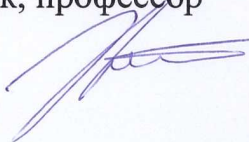
Диссертационная работа Змеевой Татьяны Алексеевны «Повышение эффективности методов санитарно-микробиологических исследований воды с использованием современных мембранных технологий и способов детекции», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Змеева Татьяна Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Почтовый адрес места работы: 170100, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

тел. 8 (4822) 32-17-79; info@tvgma.ru

доктор медицинских наук, профессор



Червинцев Вячеслав Михайлович

Подпись доктора медицинских наук, профессора Червинцева Вячеслава Михайловича заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор



Дмитрий Анатольевич Миллер

17 января 2018 г.