

Заключение комиссии Диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по кандидатской диссертации Борисовой Анастасии Борисовны на тему: «Молекулярно-генетическая диагностика и клинические особенности заболеваний, вызываемых представителями рода *Bordetella*» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни

Научный руководитель:

Афанасьев Станислав Степанович - доктор медицинских наук (03.00.07 – микробиология), профессор, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва).

Петрова Марина Семеновна - кандидат медицинских наук (14.00.09 - педиатрия), ведущий научный сотрудник клинического отдела Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва).

Диссертационная работа Борисовой А.Б. соответствует специальностям: 03.02.03 - микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни.

Работа посвящена совершенствованию методов генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени и характеристике особенностей клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*. В ходе проведенных исследований Борисовой А.Б. впервые разработана методика генодиагностики на основе мультиплексной ПЦР-РВ, основанная на идентификации фрагментов трех инсерционных элементов - IS481, hIS1001, IS1001 и фрагмента гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу коклюшного токсина, которая позволяет выявлять ДНК трех видов бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* в биологическом материале (патент на изобретение РФ № 2702240 от 12.10.2018 г.). При проведении оценки аналитической надежности разработанной методики установлено, что аналитическая чувствительность при идентификации ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii* составила 5×10^1 ГЭ / мл, аналитическая специфичность на коллекции типовых и свежесыведенных штаммов, сходимость и воспроизводимость – 100 %. Диссертантом проведена оценка диагностических характеристик разработанной методики на 845 клинических образцах от пациентов, госпитализированных в

ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» и «БУЗ ВО ОДКБ», и показано, что разработанная методика обладает 98,8 % чувствительностью, 99,2 % специфичностью и 99,0 % диагностической эффективностью. Достоверность выявления ДНК *B.holmesii* была подтверждена с помощью трех методик – изотермической амплификации (LAMP), экспериментальной серии «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и прямого секвенирования фрагментов ДНК.

С помощью разработанной методики впервые на территории РФ зарегистрирована циркуляция *B.holmesii*, как возбудителя заболевания, которое может встречаться в виде моно- и ко-инфекции с *B.pertussis* и *B.parapertussis*. Выявление заболевания, вызванного *B.holmesii*, у госпитализированных пациентов, обследованных с подозрением на коклюш, составило 2,3 %, ко-инфекция, вызванная *B.pertussis* + *B.holmesii*, встречается в 0,8 % случаев и ко-инфекция, вызванная *B.parapertussis* + *B.holmesii*, – в 0,1 % случаев. Охарактеризована клиническая картина заболевания, вызванного *B.holmesii*, которое носит коклюшеподобный характер. Показано, что основной формой клинического течения этого заболевания является типичная легкая ($90,0 \pm 6,7$ %), среднетяжелые формы зарегистрированы только в случаях сочетанного течения с коклюшем. Диссертантом впервые охарактеризованы особенности клинической картины ко-инфекции *B.holmesii* + *B.pertussis*. При среднетяжелых формах заболевания была зарегистрирована ко-инфекция *B.holmesii* + *B.pertussis*, что приводило к утяжелению клинической картины и проявлялось с виде появления дыхательной недостаточности, учащения приступов кашля и нарушений нутритивного статуса у детей раннего возраста. Установлены дифференциально-диагностические критерии заболевания, вызванного *B.holmesii*, в сравнении с коклюшем, вызванным *B.pertussis* (подана заявка на изобретение № 2020142641 от 23.12.2020 г.).

Теоретическая значимость работы заключается в том, что на основании результатов исследования обоснована необходимость использования генодиагностики при обследовании больных с подозрением на коклюш, которая будет способствовать расширению возможности идентификации разных представителей рода *Bordetella*, являющихся актуальными на сегодняшний день возбудителями коклюша и коклюшеподобных заболеваний. Проведенный мониторинг с помощью разработанной методики показал, что *B.holmesii* является возбудителем коклюшеподобного заболевания, что свидетельствует о повсеместной циркуляции этого микроорганизма в мире и в дальнейшем позволит оценить его эпидемиологическую значимость в развитии коклюшной инфекции на территории РФ.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что применение разработанной методики расширит возможности диагностики с целью повышения эффективности верификации диагноза у больных с подозрением на коклюш, в том числе при легких и атипичных формах клинического течения. Разработанная методика позволит в короткие сроки проводить обследование контактных лиц в очагах инфекции, а также длительно кашляющих для раннего выявления больных и установления причин длительного кашля у разных возрастных групп населения, а также может использоваться при мониторинге

возбудителей в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ. Показано, что, заболевание, вызванное *B.holmesii*, в большинстве случаев сложно диагностируется, оперируя только клинической картиной. Для окончательного диагноза необходимо проведение лабораторного исследования с выявлением ДНК возбудителя.

Полученные при выполнении диссертации данные используются в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора: подготовлены методические указания «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами» с учетом возможности выявления *B.holmesii* в бактериологической и молекулярно-генетической диагностике; результаты исследований по оценке эффективности ПЦР-диагностики на территории РФ послужили основой аналитической справки «Состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2013 - 2017 гг.» и были представлены на Проблемной комиссии Ученого Совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики» (26.12.2019 г.); использованы в информационном материале при проведении региональных семинаров по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша (Ханты-Мансийск, 2019 г.; Владивосток, 2019 г.) (акт внедрения от 01.12.2020 г.). Результаты диссертационной работы используются в учебно-образовательном процессе кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинской университет» МЗ РФ (акт внедрения от 19.11.2020 г.)

Работа выполнена с применением современных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Представленные результаты являются достоверными, поскольку проведен достаточный объем исследований. Научные положения и выводы, сформулированные Борисовой А.Б., логически вытекают из результатов, полученных в ходе исследований.

По объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Анализ проверки с помощью системы «Антиплагиат» на сайте www.antiplagiat.ru показал, что оригинальный текст составляет 83,17 %, самоцитирование – 11,21%, цитирование – 0,05%.

Материалы исследования и основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на 5 российских и международных конференциях и конгрессах.

Диссертация не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых изданиях, 2 – в материалах

конференций и 1 патент на изобретение РФ. Подана заявка на изобретение.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета Д 208.046.01. В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. Согласие ведущей организации имеется.

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

- Кафтырева Лидия Алексеевна - доктор медицинских наук (03.00.07 – микробиология), 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.
- Усенко Денис Валериевич - доктор медицинских наук (14.01.09 – инфекционные болезни), ведущий научный сотрудник клинического отдела инфекционной патологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Согласие официальных оппонентов имеется.

В связи с тем, что диссертация выполнена по двум специальностям: 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни, ввести в состав Диссертационного Совета на разовую защиту с правом решающего голоса трех докторов наук по специальности 14.01.09 – инфекционные болезни:

- Феклисову Людмилу Владимировну, доктора медицинских наук, профессора, профессора курса детских инфекционных болезней факультета усовершенствования врачей Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского»; член действующего Диссертационного совета ДСУ 208.114.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;
- Понежеву Жанну Бетовну, доктора медицинских наук, заведующую клиническим отделом инфекционной патологии «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; член действующего Диссертационного совета ДСУ 208.114.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;
- Еровиченкова Александра Анатольевича, доктора медицинских наук, профессора, профессора кафедры инфекционных болезней Федерального

государственного бюджетного образовательного учреждения
дополнительного профессионального образования «Российская
медицинская академия непрерывного последипломного образования»
Минздрава России; член действующего Диссертационного совета Д
208.071.02 на базе Государственного бюджетного образовательного
учреждения дополнительного профессионального образования «Российская
медицинская академия последипломного образования» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Заключение:

комиссия Диссертационного совета Д208.046.01 рекомендует диссертацию
Борисовой Анастасии Борисовны «Молекулярно-генетическая диагностика и
клинические особенности заболеваний, вызываемых представителями рода
Bordetella» по специальностям: 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 –
инфекционные болезни к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета Д 208.046.01:

Председатель:

Руководитель отдела микробиологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, профессор



А.Ю. Миронов

Члены комиссии:

Профессор кафедры микробиологии, вирусологии
и иммунологии медико-профилактического факультета
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
доктор медицинских наук, профессор



Ю.В. Несвижский

Профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
доктор медицинских наук, профессор



В.И. Кочеровец

Заведующий отделом клинической фармакологии
с центром клинических исследований
ГКБ № 67 им. Л.А. Ворохобова ДЗМ,
доктор медицинских наук, профессор



С.Д. Митрохин