

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России

Доктор медицинских наук

Усков А.Н.

«18» сентября 2022 г.



### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»

Диссертация МАРТЕНС Эльвиры Акрамовны «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11 – «Микробиология (медицинские науки)» выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России).

Мартенс Эльвира Акрамовна окончила Омскую государственную медицинскую академию в 2001 году, медико-профилактический факультет, с присвоением квалификации «врач», по специальности «медико-профилактическое дело».

Мартенс Э.А. была прикреплена в качестве соискателя в период подготовки диссертации к Федеральному государственному бюджетному учреждению «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» протокол №6 от 21.06.2018

г. Соискатель Э.А. Мартенс с 2021 года работала в должности младшего научного сотрудника в научно-исследовательском отделе медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства России. Справка об обучении №24/19 выдана 25.06.2019 г. Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель - Сидоренко Сергей Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства России», заведующий научно-исследовательским отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии.

По итогам обсуждения диссертации «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей» **принято следующее заключение:**

Диссертация Мартенс Эльвиры Акрамовны является законченной научно-квалификационной работой, в которой представлены сведения и результаты о фенотипической и генотипической характеристике выделенных изолятов *Neisseria meningitidis*, являющихся одними из важнейших параметров эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией, поскольку полученные результаты можно использовать для прогнозирования течения эпидемического процесса и выбора научно-обоснованной программы иммунопрофилактических мероприятий. Это обосновывает актуальность данного исследования. Полученные результаты позволят

рекомендовать для определения антибиотикочувствительности *Neisseria meningitidis* метод с использованием МИС-полосок (Е-тест) и метод разведений в агаре для использования в лабораторной практике здравоохранения, а для лечения генерализованных форм менингококковой инфекции в качестве препаратов выбора - цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон или цефотаксим); для профилактики – цiproфлоксацин или цефтриаксон или рифампицин с учетом возрастных ограничений. При микробиологической диагностике менингококковой инфекции целесообразно проводить углубленное изучение выделенных изолятов для выявления родственных связей с глобальными гипервирулентными генетическими линиями, а также для отслеживания динамики антибиотикорезистентности изолятов *Neisseria meningitidis*. Оптимизированный алгоритм исследования рекомендуется использовать для идентификации и типирования *Neisseria meningitidis* как изолятов, так и для обнаружения возбудителя в биологических образцах (кровь, цереброспинальная жидкость) больных генерализованными формами менингококковой инфекции и носителей (назофарингеальные мазки) в практических лабораториях здравоохранения.

#### Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в сборе, анализе научной литературы, планировании и проведении экспериментальной части, в выполнении молекулярно-генетических исследований, а также бактериологических и серологических, пополнении коллекции изолятов *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных и носителей. Разделы работы по молекулярным исследованиям, включая полногеномное секвенирование, выполнены совместно со с.н.с. научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.б.н. Гостевым В.В., врачом КЛД клинико-диагностической лаборатории ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА Калисниковой Е.Л.

Посев, выделение чистой культуры, идентификация, определение серогрупп изолятов *N. meningitidis* с помощью типоспецифических сывороток выполнены совместно с врачом-бактериологом, с.н.с. научно-исследовательского отдела ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, к.м.н. Железовой Л.И. Биоинформатическая обработка результатов, полученных в ходе полногеномного секвенирования выполнена совместно с лаборантом-исследователем научно-исследовательского отдела ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Лихолетовой Д.В. Статистическую обработку осуществляли совместно со старшим научным сотрудником научно-исследовательского отдела по организации и управлению научно-исследовательскими работами, профессором, доктором медицинских наук Григорьевым С.Г.

**Степень достоверности результатов проведенных исследований.** Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом выборки изолятов *Neisseria meningitidis*.

Методики исследования современные, выводы логичны и вытекают из содержания работы. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам, а сформулированные положения, выводы и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из анализа полученных данных. Собранные материалы были подвергнуты тщательной комплексной обработке с использованием биоинформатических и статистических методов, принятых в современной науке. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической науки. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, хорошо обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Диссертационная работа по теме «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей», выполнена в рамках

НИР 019-К1 по теме «Фенотипическая и молекулярно-генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и здоровых носителей». По техническому заданию НИР 019-К1 выполнена медицинская технология «Молекулярные методы для детекции и типирования (определение серогруппы) *Neisseria meningitidis*, выделенных у пациентов с генерализованными формами менингококковой инфекции и у носителей» и утверждена на Ученом совете от 29.09.2022 года протокол №9.

Апробация работы состоялась на заседании Ученого совета в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России), протокол №10 от 28 декабря 2021 года.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: Российской научно-практической конференции «Менингококковая инфекция: прежний опыт и новые угрозы. Другие бактериальные и вирусные поражения нервной системы» (Санкт-Петербург, 30–31 января 2018 г.); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Санкт-Петербургский септический форум – 2018» (Санкт-Петербург, 12–14 сентября 2018 г.); Четвертой Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов» (Москва 14–15 ноября 2018 г.); Международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г.); XXII Кашкинские чтения. Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 12–15 июня 2019 г.); Межрегиональной научно-практической конференции с

международным участием «Санкт-Петербургский септический форум – 2019» (Санкт-Петербург, 11–13 сентября 2019 г.); XXIII Кашкинские чтения. Российско-китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 9–11 ноября 2020 г.); XXIV Кашкинские чтения. Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 9–11 июня 2021 г.); на 31<sup>st</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Online 9-21 July 2021); на VII Национальном конгрессе бактериологов (Санкт-Петербург, 28-30 сентября 2022 г.).

#### Научная новизна исследования

Впервые охарактеризована структура популяции *N. meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Выявлена высокая гетерогенность менингококков по ядерному геному, 53 жизнеспособных изолята относились к 12-ти сиквенс-типам и 8-ми клональным комплексам. При этом три сиквенс-типа (ST-1136, ST-2146 и ST-9126) и три клональных комплекса (СС-174, СС-1136 и СС-198) ранее в России не встречались.

Впервые выявлено, что российские изоляты серогруппы W, относящиеся к ST-11 (W-ST11), образуют отдельную генетическую линию, тесно связанную с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj. Эта линия, в свою очередь, была разделена на три сублинии: одна - изоляты из Москвы и две - изоляты из Санкт-Петербурга.

В серогрупповом составе менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, выявлено преобладание серогруппы В. Впервые проведена оценка соответствия антигенного состава субкапсулярных вакцин 4СMenВ и rLP2086 и менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Установлено, что нетипируемые изоляты *N. meningitidis*, несущие локус *cnI*, распространены, в основном среди здоровых носителей, но могут вызывать и

генерализованные формы менингококковой инфекции у детей в возрасте от 0 до 17 лет.

Впервые установлено, что снижение чувствительности к пенициллину у менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, связано с формированием мутаций в гене *penA*. Выявлена корреляция между указанными мутациями и повышенными значениями МПК пенициллина, определяемыми методами серийных разведений в агаре и градиентной диффузии. Повышенные значения МПК пенициллина, определяемые методом серийных разведений в бульоне, не коррелировали с указанными мутациями.

#### Теоретическая и практическая значимость работы

Полученный комплекс генетических и фенотипических характеристик популяции менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, дополняет теоретические представления о распространении глобальных генетических линий и их эволюции на локальном уровне, а также позволяет обосновать стратегию профилактики и лечения менингококковых инфекций.

Обнаружение доминирования среди менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге изолятов серогруппы В, обосновывает необходимость внедрения в практику иммунопрофилактики менингококковых инфекций вакцин, обеспечивающих защиту от инфицирования бактериями этой серогруппы. В то же время, на основании полученных данных можно предположить, что современные субкапсулярные вакцины 4СMenВ и rLP2086 могут обеспечить протективный эффект в отношении соответственно 28.6% и 42.9% менингококков серогруппы В, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Очевидна необходимость разработки отечественной вакцины в большей степени соответствующий антигенному составу менингококков, циркулирующих в регионе.

Показано, что в настоящее время цефтриаксон может рассматриваться в качестве надежного средства эмпирической терапии менингококковых

инфекций, поскольку устойчивости к этому антибиотику среди менингококков не выявлено. Однако снижение чувствительности к пенициллину, обусловленное мутациями в гене *penA* белка, может быть начальным этапом формирования устойчивости к цефалоспорином. Указанная негативная тенденция обосновывает необходимость внедрения стандартных и воспроизводимых методов оценки чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам.

Установлено, что методы оценки чувствительности менингококков в агаре (серийных разведений и градиентной диффузии), позволяют получить более достоверные результаты по сравнению с методом серийных разведений в бульоне. Методы оценки чувствительности в агаре могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике здравоохранения.

Показано, что внедрение молекулярных методов в алгоритм диагностики менингококковых инфекций и типирования возбудителя позволяет существенно сократить срок исследования и обеспечить идентификацию и типирование как жизнеспособных изолятов *N. meningitidis*, так и их ДНК непосредственно из биологического материала

Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ при проведении сертификационных циклов повышения квалификации для врачей по специальности «Бактериология» и дополнительные профессиональные программы повышения квалификации врачей «Бактериальные менингиты», «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам», а также в лекционный материал при обучении врачей-ординаторов (Акт внедрения от 28.09.2021). Предложения по совершенствованию лабораторной диагностики менингококковой инфекции внедрены в работу клинико-диагностической



лаборатории ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства (Акт внедрения от 23.09.2021г.), специализированной централизованной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 22 (Акт внедрения от 24.09.2021).

#### Соответствие специальности

Работа посвящена одной из актуальных проблем клинической микробиологии - изучению генетических особенностей изолятов *Neisseria meningitidis*, относящихся к гипервирулентным генетическим линиям, циркулирующим в Российской Федерации. Тема диссертационного исследования соответствует паспорту специальности 1.5.11 - Микробиология. Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в которых отражено основное содержание диссертации, из них 9 – статьи в рецензируемых изданиях.

#### Наиболее значимые работы:

1. Киселева, Е.Е. Использование метода мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления и идентификации патогенов в гемокультурах у педиатрических пациентов / Е.Е. Киселева, В.Н. Чеботкевич, Э.А. Мартенс, С.С. Бессемельцев // Вестник гематологии. – 2018. - Т. 14, №4. - С. 36.

2. *Martens, E.A.* Comparison of phenotypic and molecular-genetic properties of the strains *Neisseria meningitidis* isolated from patients with generalized forms of meningococcal infection and carriers / *E.A. Martens, S.V. Sidorenko, L.I. Zhelezova* // Мат. международной конф. «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г. – Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, №. 4. – С. 515.

3. Sidorenko, S. Observational study of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in entrants and first-year military students in the Russian Federation / S.

Sidorenko, Y. Lobzin, *E. Martens* et. al. // International Journal of Infectious Diseases. – 2019. - Т. 81. - С. 12-16.

4. Маркова, К.В. Менингококковая инфекция в современных условиях: клинические, микробиологические и профилактические аспекты / К.В. Маркова, Н.В. Скрипченко, Ю.В. Лобзин, В.Е. Карев, А.А. Вильниц, Е.Ю. Горелик, *Э.А. Мартенс*, С.В. Сидоренко // Педиатр. – 2020. - Т.11, №3. - С. 81-92.

5. Шарабханов, В.В. Последствия перенесенной менингококковой инфекции тяжелого течения / В.В. Шарабханов, К.В. Жданов, С.М. Захаренко, С.В. Сидоренко, *Э.А. Мартенс*, К.С. Иванов, М.В. Яременко // Лечение и Профилактика. – 2020. – Т. 10, №2. - С. 71-76.

6. Жданов, К.В. Проблемы вакцинопрофилактики менингококковой инфекции в Вооруженных Силах / К.В. Жданов, С.М. Захаренко, К.С. Иванов, К.В. Козлов, Ю.И. Ляшенко, С.В. Сидоренко, *Э.А. Мартенс* // Военно-медицинский журнал. - 2021. - Т. 342, №6. - С. 36-42.

7. Маркова, К.В. Клинико-микробиологические особенности менингококковой инфекции у детей / К.В. Маркова, Е.Ю. Скрипченко, Н.В. Скрипченко, А.А. Вильниц, Л.Н. Мазанкова, С.В. Сидоренко, *Э.А. Мартенс*, Е.Ю. Горелик // Практическая медицина. – 2021. - Т. 19, №2. - С. 61-69.

8. *Martens, E.* Genomic characterization of *Neisseria meningitidis* from the Russian Federation / *E. Martens*, L. Zhelezova, D. Likholetova, V. Gostev, S. Sidorenko // Materials of the 31th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Viena, Austria, 9-11 July 2021 г. – 04542 – ePoster Presentation.

9. Мартенс, Э.А. Антибиотикочувствительность *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и от здоровых носителей / Э.А. Мартенс, Л.И. Железова, В.В. Гостев, Д.В. Лихолетова, Д.П. Гладин // Антибиотики и химиотерапия. – 2022. - Т. 67, №5-6. – С. 19-24.

10. Мартенс, Э.А. Молекулярная характеристика *Neisseria meningitidis* серогруппы W в Санкт-Петербурге / Э.А. Мартенс, Л.И. Железова, В.В. Гостев, Д.В. Лихолетова, С.М. Захаренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2022. - Т. 67, №5-6. – С. 14-18.

**По итогам заседания принято следующее решение:**

Кандидатская диссертация Мартенс Эльвиры Акрамовны «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей» рекомендуется к официальной защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – Микробиология (медицинские науки).

Заключение принято на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней федерального медико-биологического агентства». Присутствовало 19 человек. Результаты голосования: «за» - 19 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол №10 от 28 декабря 2021 года.

Ученый секретарь  
ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России  
Доцент, кандидат медицинских наук

В.М. Волжанин

Председатель Ученого совета  
ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России  
Заслуженный деятель науки РФ  
Академик РАН  
Профессор, доктор медицинских наук



Ю.В. Лобзин