

Заключение Комиссии диссертационного совета Д 208.046.01 при ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора по кандидатской диссертации Чагиной Ирины Алексеевны: «Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*» по специальности 03.02.03 – микробиология

Научный руководитель:

Борисова Ольга Юрьевна – доктор медицинских наук, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций 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 Роспотребнадзора)

Диссертационная работа Чагиной И.А. соответствует специальности 03.02.03 – микробиология (медицинские науки).

Работа посвящена изучению микробиологических (антибиотикочувствительность) и молекулярно-генетических (структура генов патогенности) свойств циркулирующих штаммов *C. diphtheriae*, молекулярных механизмов резистентности и закономерностей циркуляции сиквенс-типов штаммов возбудителя дифтерии. В ходе проведенного исследования установлено, что 5,6% штаммов *C. diphtheriae* являются резистентными к антибактериальным препаратам пенициллинового ряда, 3,6 – 3,7% штаммов к макролидам и 4,7% - к рифампицину; множественной резистентностью обладают 3,8% штаммов. Показано, что молекулярный механизм резистентности штаммов *C. diphtheriae* к макролидам обусловлен наличием гена *erm(X)*, локализованного на плазмиде; а резистентность к рифампицину - мутациями в трех позициях гена *rpoB*, затрагивающих кодоны аминокислот H431N, S436F, S436Y, P495L и P495Q в β субъединице РНК-полимеразы. Автором впервые изучен геном мультирезистентного штамма *C. diphtheriae*, драфтовый сиквенс которого депонирован в GenBank: JZUJ000000000 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JZUJ000000000.1>). Чагиной И.А. получены новые данные о структуре генов патогенности у токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в 2010-2015 гг. Выявлены мутации в 6 позициях гена *tox*, из которых впервые показаны мутации в позиции (-19) в промоторной области и у четырех штаммов *C. diphtheriae* - в позиции 913 (A305T) в Т домене В субъединицы дифтерийного токсина; в гене *dtxR* обнаружены мутации в 15 позициях, из которых новая мутация в позиции (-23) промоторной области и ранее описанные мутации в позициях 440 (A147V) и 640 (L214I) гена *dtxR*, что подтверждает нарастание у современных штаммов *C. diphtheriae* полиморфизма в генах патогенности, кодирующих дифтерийный токсин и регуляторный DtxR белок. Автором расшифрован молекулярный механизм отсутствия экспрессии гена *tox* у четырех НТТН-штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в 2010 – 2015 гг., заключающийся в выпадении нуклеотида G в позиции 55 гена *tox*, приводящем к сдвигу рамки считывания и нефункциональности гена. В структуре гена *dtxR* впервые у НТТН-штаммов *C. diphtheriae* выявлено наличие двух мутаций, одна из которых была ранее описана у токсигенных штаммов и вторая новая мутация в позиции 126 гена *dtxR*. Впервые с помощью мультилокусного секвенирования (МЛСТ) получены новые данные о структуре популяции циркулирующих в России штаммов *C. diphtheriae* и идентифицировано 36 сиквенс-типов. Показаны взаимосвязи между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C. diphtheriae* к определенному сиквенс-типу - токсигенные и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* различных биоваров, а также НТТН-штаммы *C. diphtheriae* с различным механизмом отсутствия экспрессии гена дифтерийного токсина характеризовались определенными сиквенс-типами, что вносит существенный вклад в характеристику популяции возбудителя дифтерии.

Теоретической значимостью работы является то, что полученные данные о биологических свойствах *C. diphtheriae* расширяют представления о молекулярных механизмах антибиотикорезистентности и клональной организации популяции, закономерностях циркуляции штаммов, степени их филогенетического родства и эволюции возбудителя дифтерийной инфекции.

Практическая значимость заключается в том, что своевременное выявление

антибиотикорезистентных штаммов *C.diphtheriae* позволит проводить адекватную антибиотикотерапию и ее коррекцию при санации дифтерийных бактерионосителей. Определены возможности использования мультилокусного секвенирования для генотипирования штаммов *C.diphtheriae*, что будет способствовать повышению эффективности эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией при установлении источника и расшифровке очагов инфекции, слежении за появлением и распространением генотипов, и завозных случаев на территорию России. Тринадцать штаммов *C.diphtheriae* депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» в качестве контрольных штаммов для проведения внешнего контроля качества бактериологических исследований и генотипирования *C.diphtheriae* при проведении молекулярно-генетического мониторинга возбудителя в системе эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией. Создана коллекция ДНК из штаммов *C.diphtheriae*, обладающих различным уровнем антибиотикочувствительности и характеризующихся принадлежностью к разным сиквенс-типам, который можно использовать в дальнейших исследованиях для прогнозирования распространения эпидемически значимых штаммов возбудителя дифтерии, а также изучения у них молекулярно-генетических механизмов антибиотикорезистентности.

Результаты микробиологического и молекулярно-генетического мониторинга штаммов *C.diphtheriae* используются в работе Референс-центра по мониторингу возбудителей кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и в лекционном материале на 5 региональных семинарах по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша для бактериологов Уральского, Дальневосточного, Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, Алтайского края, г. Москвы, республик Горный Алтай, Хакасия, Бурятия и Тыва, а также послужили основой информационно-методического Письма Роспотребнадзора от 16.12.2015 № 01/15524-15-27 "О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по диагностике дифтерии и качества питательных сред в Российской Федерации» (акты внедрения от 02.02.2016 г. и ...)

Работа выполнена с применением современных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Представленные результаты являются достоверными, так как был проведен достаточный объем исследований. Научные положения и выводы, сформулированные Чагиной И.А., логически вытекают из результатов проведенных 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 специальности 03.02.03 – микробиология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники.

Материалы исследования и основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на 8 Всероссийских научно-практических конференциях и Заседании секции медицинской и фармацевтической микробиологии Московского отделения ВНПОЭМП.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях, 1 – в другом издании, 8 – в материалах конференций. В GenBank зарегистрирован драфтовый геном мультирезистентного штамма *C.diphtheriae* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JZUJ000000000.1>)

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи)

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

Быков Анатолий Сергеевич - доктор медицинских наук, профессор (03.02.03 – микробиология), профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего профессионального образования "Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России)

Тец Виктор Вениаминович - доктор медицинских наук, профессор (03.02.03 – микробиология), академик РАЕН член Нью-Йоркской Академии наук, Соросовский профессор 1997, 1998, 1999; член Президиума Санкт-Петербургского отделения Российского общества микробиологов, паразитологов и эпидемиологов, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика Д.К. Заболотного, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. ак. И.П. Павлова МЗ РФ).

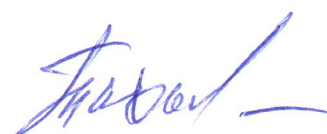
Согласие оппонентов и ведущей организации имеются.

Заключение: комиссия диссертационного совета рекомендует диссертацию Чагиной Ирины Алексеевны: «Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*» по специальности 03.02.03 – микробиология к приему к защите.

Заключение подготовили члены Диссертационного совета:

Председатель:

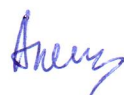
Руководитель лаборатории прикладной иммунохимии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор



Н.Т. Тихонова

Члены комиссии:

Главный научный сотрудник лаборатории
клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук



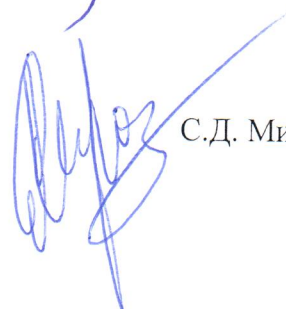
А.В. Алешкин

Главный научный сотрудник лаборатории
клинической микробиологии и биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор



Г.А. Дмитриев

Руководитель отдела клинической фармакологии
Городской клинической больницы № 67 им. Л.А. Ворохобова
Департамента здравоохранения г. Москвы,
доктор медицинских наук, профессор



С.Д. Митрохин