

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор биологических наук, профессор, академик РАН

А.Л. Гинцбург

2018 г.



ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертационной работы Пименовой Алены Сергеевны на тему: «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Актуальность темы выполненной работы.

Несмотря на очевидные успехи многолетней массовой иммунизации населения, актуальность проблемы коклюшной и дифтерийной инфекций сохраняется.

По данным ВОЗ и CDC в последние годы в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками регистрируется высокая заболеваемость

регистрируются вспышки с формированием очагов разной интенсивности в организованных детских коллективах, растёт число детей, получивших возбудитель от «практически здоровых» взрослых в семьях. Увеличивается удельный вес стертых и легких форм болезни среди детей старшей возрастной группы и взрослых. Среди практически здоровых людей участились случаи выявления возбудителя коклюша.

Дифтерия остается эндемичным заболеванием в Индии, Индонезии, Пакистане, Иране, Непале, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике, а в Таиланде, Лаосе и странах Африки периодически регистрируются локальные вспышки. Тогда как в благополучных странах, со спорадическими случаями заболеваний опыт клинического и бактериологического распознавания дифтерии постепенно утрачивается.

Молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики коклюша применяются в различных странах с конца 1980-х годов. Чувствительность метода ПЦР при обнаружении ДНК *B.pertussis* в исследуемом материале варьирует от 73 % до 100 %. При этом унифицированной ПЦР тест-системы для диагностики коклюша на сегодняшний день не существует, так как различия в выборе генов-мишеней и систем для их детектирования препятствуют стандартизации метода и созданию единой концепции диагностики коклюша с помощью амплификационных технологий. Тем не менее, применение методов генодиагностики обеспечивает быструю, раннюю и эффективную диагностику коклюша у пациентов с различными формами клинического течения болезни, так и у больных через три недели и позже после начала кашля на фоне антибиотикотерапии не зависимо от вакцинального статуса. Часто удаётся выявлять возбудитель у контактировавших с больными практически здоровыми людьми.

На данный момент на территории Российской Федерации официально зарегистрирован лишь один набор реагентов для выявления и дифференциации

ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза в биологическом материале методом ПЦР. При этом исследования по разработке методик для обнаружения ДНК *B.pertussis* ведутся в единичных научных учреждениях России.

В лабораторной диагностике дифтерии в настоящее время применяется только бактериологический метод. Основным и определяющим недостатком этого метода является его продолжительность, которая составляет три рабочих дня в случае положительного результата и пять рабочих дней – в случае отрицательного. Велика вероятность совершения ошибок, связанных с человеческим фактором, поскольку исследование предполагает проведение многочисленных и разноплановых манипуляций различной сложности. Результаты, получаемые в ходе бактериологического исследования, зависят от качества используемых питательных сред и реактивов, условий и сроков их хранения. Кроме того, эффективность метода находится в прямой зависимости от своевременного и правильного взятия патологического материала у обследуемого и соблюдения сроков доставки его в лабораторию.

Молекулярно-генетические методы, с помощью которых стало возможным выявлять в биологическом материале специфические фрагменты генома *C.diphtheriae*, используются только в научных целях и требуют дальнейшего развития.

Таким образом, тема диссертационной работы Пименовой Алены Сергеевны, посвященная совершенствованию молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша, является важной и актуальной.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Основу научной новизны результатов, полученных Пименовой А.С., составляет разработка способов для выявления ДНК возбудителей коклюша и

дифтерии в биологическом материале методом изотермической амплификации (LAMP) и методом мультиплекс-ПЦР.

Диссертантом оптимизирован метод генодиагностики на основе LAMP-технологии, позволяющий обнаружить ДНК *B.pertussis* в биологическом материале в течение 4 - 5 часов от начала исследования. Определены его аналитические характеристики: аналитическая чувствительность составила 10^2 ГЭ / мл, аналитическая специфичность – 100 %. Что особенно важно и ценно, проведена грамотная оценка валидности разработанного диагностического теста: диагностическая чувствительность составила 99,6 %, диагностическая специфичность – 98,7 %, индекс точности – 99,4 %. Показана высокая эффективность данного метода при обследовании пациентов с различными формами клинического течения, на разных сроках болезни и на фоне приема антибактериальных препаратов, особенно у детей до 1 года, являющихся основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш с наибольшим риском развития осложнений и тяжелых форм клинического течения, приводящих к смерти.

Несомненной заслугой автора является предпринятая попытка внедрения молекулярно-генетических методов для обследования контактных лиц в очагах коклюшной инфекции. С помощью разработанного метода ДНК *B.pertussis* была выявлена у 17,9 % контактных при обследовании трех эпидемических очагов и у 5,2 % человек при обследовании пяти организованных коллективов с длительно кашляющими детьми. При этом в семейных очагах среди взрослых выявлено 47,5 % больных стертыми и легкими формами коклюша, а в 27,5 % случаях обнаружено бактерионосительство *B.pertussis*, которое в 72,7 % случаев сопровождалось наличием специфических противокклюшных антител разных классов. Таким образом, применение молекулярно-генетических методов для обследования контактных в очагах коклюша и в организованных коллективах с длительно кашляющими лицами позволит

активно выявлять не только больных на разных стадиях течения инфекционного процесса, но и бактерионосителей.

Успешными оказались и усилия автора по разработке молекулярно-генетического метода лабораторной диагностики дифтерии. Диссертантом впервые применен способ генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP), позволяющий обнаружить ДНК возбудителя дифтерии в биологическом материале в течение 4 - 4,5 часов от начала исследования. Аналитическая чувствительность метода составила $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл, аналитическая специфичность – 100 %.

В результате проведенной работы автором предложена новая комбинация ДНК-мишеней (нуклеотидные последовательности генов дифтерийного токсина, репрессора дифтерийного токсина, амилазы и РНК-полимеразы), благодаря которой при проведении мультиплекс-ПЦР выявляются генетические детерминанты, определяющие токсигенность и биотип возбудителя дифтерии и позволяющие дифференцировать *C.diphtheriae* от других клинически значимых представителей рода *Corynebacterium*. Разработан способ идентификации *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и *Corynebacterium spp.* на основе метода мультиплекс-ПЦР, позволяющий дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с делецией нуклеотида G в позиции 55 или вставкой мобильного генетического IS-1 элемента в гене *tox*, токсигенные и нетоксигенные штаммы *C.ulcerans* и других представителей рода *Corynebacterium*. С целью использования в практическом здравоохранении разработан способ выявления и дифференциации ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis* и *C.ulcerans* на основе метода мультиплекс-ПЦР в клиническом материале; аналитическая чувствительность метода составила $2,3 \times 10^3$ ГЭ / мл, аналитическая специфичность – 100 %.

В целом, используемые материалы, примененные методы исследований,

объем проведенных экспериментов обеспечивают выполнение поставленных перед диссертантом задач и научное обоснование выводов и рекомендаций.

Выводы обоснованы и соответствуют результатов проведенных исследований.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки.

Диссертационная работа Пименовой А.С. выполнена в рамках научно-исследовательской работы 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 «Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг коклюшной и дифтерийной инфекций. Унификация лабораторной диагностики этих инфекций» (Рег. № 01201157142), «Разработка молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша» (Рег. № АААА-А16-116101810127-7), «Изучение роли микробиоценозов ротоглотки и крови при дифтерии, коклюше и других инфекционно-воспалительных заболеваний» (Рег. № АААА-А16-116021550311-2).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации.

Значительная практическая ценность работы определяется возможностью использование предложенных автором способов генодиагностики возбудителей коклюша и дифтерии для обследования больных и контактных лиц в очагах и быстрой и надёжной диагностики заболеваний и выявления потенциально опасных носителей инфекции. Улучшение и ускорение диагностики этих инфекционных заболеваний особенно важно в периоды подъёма заболеваемости для быстрой локализации его очагов.

Автором создана рабочая коллекция образцов ДНК микроорганизмов рода

Corynebacterium и рода *Bordetella* с целью дальнейшего изучения их внутривидового и межвидового генетического полиморфизма. Диссертантом депонировано в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» 60 штаммов микроорганизмов (18 штаммов *C.diphtheriae*, 11 штаммов *C.ulcerans*, 13 штаммов микроорганизмов рода *Corynebacterium*, 9 штаммов *B.pertussis*, 6 штаммов *B.parapertussis* и 2 штамма *B.bronchiseptica*) в качестве контрольных типовых штаммов для научных исследований при изучении биологических свойств возбудителей в системе эпидемиологического надзора за дифтерийной и коклюшной инфекциями и микробного пейзажа микрофлоры ротоглотки у больных с патологией верхних дыхательных путей и у практически здоровых людей.

Достоверность результатов исследования не вызывает сомнения. Работа основана на большом объеме материала и современных методах сбора и обработки информации с использованием как традиционных (микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформативных), так и инновационных (масс-спектрометрических) методов исследования микроорганизмов.

Полученные автором результаты внедрены в работу Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии 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. Разработанные способы генодиагностики возбудителей коклюша и дифтерии применяются при проведении молекулярно-генетического мониторинга популяции штаммов *B.pertussis* и *C.diphtheriae*, циркулирующих на территории России, что позволяет повысить эффективность эпидемиологического надзора за этими инфекциями. Результаты диссертационной работы успешно используются на

региональных семинарах для специалистов лабораторной сети по диагностике дифтерии и коклюша в субъектах Российской Федерации и в педагогическом процессе при чтении лекций и проведении практических занятий на курсах повышения квалификации для врачей-бактериологов филиалов Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве».

Диссертантом опубликовано 11 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях. Основные результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 7 российских и международных научно-практических конференциях различного уровня.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты диссертационного исследования Пименовой А.С. могут быть использованы в преподавании курса микробиологии и эпидемиологии при чтении лекций и проведении практических занятий в медицинских ВУЗах и учебных программах последипломного дополнительного образования врачей-КЛД, врачей-инфекционистов и эпидемиологов. Коллекция ДНК может быть использована другими лабораториями, работающими в сфере создания молекулярно-генетических методов и тест-систем для диагностики коклюша и дифтерии.

Результаты и выводы диссертационного исследования должны быть учтены в работе Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора.

Полученные автором результаты должны быть внедрены в повседневную практическую деятельность лабораторий лечебно-профилактических медицинских организаций, проводящих диагностические исследования при обследовании пациентов с подозрением на коклюш и дифтерию.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 03.02.03 – микробиология.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Результаты исследований Пименовой А.С. обсуждены, и отзыв одобрен на научной конференции отдела медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 6 от 15 марта 2018 года).

Заключение.

Диссертационная работа Пименовой Алены Сергеевны «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, выполненная под руководством доктора медицинских наук, доцента Борисовой Ольги Юрьевны, содержит новое решение актуальной научной задачи – совершенствование и апробация молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша, основанных на технологиях амплификации нуклеиновых кислот.

По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Пименовой Алены Сергеевны «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша» отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, № 650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года «О внесении изменений в Положение о присуждении

ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Пименова Алена Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Руководитель лаборатории генетики бактерий
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор биологических наук

Геннадий Иванович Каратаев

123098, Российская Федерация, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

Телефон: +7 (499) 193-71-71, e-mail: kozhevnikova@gamaleya.org.

Подпись Каратаева Геннадия Ивановича заверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кандидат биологических наук



Людмила Кондратьевна Кожевникова