

**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 Пименовой Алены Сергеевны на тему: «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша» по специальности 03.02.03 – микробиология.**

Научный руководитель:

Борисова Ольга Юрьевна – доктор медицинских наук, доцент, 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 Пименовой А.С. соответствует специальности 03.02.03 - микробиология (медицинские науки).

Работа посвящена оптимизации способа выявления ДНК возбудителя коклюша методом LAMP с определением его аналитических и диагностических характеристик и разработке способов идентификации возбудителя дифтерии методами LAMP и ПЦР в формате мультиплекс с определением их аналитических характеристик. Усовершенствованный способ лабораторной диагностики коклюшной инфекции на основе метода LAMP позволяет выявить возбудителя заболевания в биологическом материале в течение 4 - 5 часов от начала исследования и эффективен (диагностическая чувствительность составила 99,6 %, диагностическая специфичность - 98,7 %, диагностическая эффективность - 99,4 %) при обследовании больных с различной тяжестью клинического течения, на разных сроках от начала заболевания и на фоне приема антибактериальных препаратов, а также при обследовании детей в возрасте до 1 года. Показаны возможности его использования при обследовании контактных лиц в эпидемических очагах, в частности в семейных, и в организованных коллективах с длительно кашляющими детьми. Разработанный способ генодиагностики дифтерии на основе метода LAMP дает возможность обнаружить ДНК возбудителя 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 %. Предложена новая комбинация ДНК-мишеней (нуклеотидные последовательности генов дифтерийного токсина, репрессора дифтерийного токсина, амилазы и РНК-

полимеразы), благодаря которой при проведении ПЦР в формате мультиплекс 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 %.

Теоретической значимостью работы является то, что применение способов генодиагностики возбудителей дифтерии и коклюша на основе методов амплификации нуклеиновых кислот (LAMP и ПЦР в формате мультиплекс) в практическом здравоохранении РФ позволит расширить представление о бактерионосительстве при этих инфекциях и может служить основой для разработки новых подходов при обследованиях с профилактической и диагностической целями, изучения механизмов и продолжительности бактерионосительства.

Практическая значимость заключается в том, что применение разработанных способов генодиагностики возбудителей дифтерии и коклюша повысит качество лабораторной диагностики при этих инфекциях с целью обследования больных и контактных лиц в очагах на разных стадиях течения инфекционного процесса. В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» депонировано 60 штаммов микроорганизмов (восемнадцать штаммов *C.diphtheriae*, одиннадцать штаммов *C.ulcerans*, тринадцать штаммов микроорганизмов рода *Corynebacterium*, десять штаммов *B.pertussis*, шесть штаммов *B.parapertussis* и два штамма *B.bronchiseptica*) в качестве контрольных типовых штаммов для проведения внешнего контроля качества бактериологических исследований, а также 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. Создана рабочая коллекция образцов ДНК микроорганизмов рода *Corynebacterium* и рода *Bordetella* с целью дальнейшего

изучения их внутривидового и межвидового генетического полиморфизма.

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 при проведении молекулярно-генетического мониторинга популяции штаммов *B.pertussis* и *C.diphtheriae* и были представлены в лекционном материале на практических семинарах по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша для врачей-бактериологов в субъектах Российской Федерации – 2012 г., Екатеринбург; 2013 г., Хабаровск; 2014 г., Горно-Алтайск; 2015 г. и 2016 г., Москва; 2015 г. и 2016 г., Ростов-на-Дону; 2016 г., Ярославль; 2016 г., Санкт-Петербург; 2016 г., Ставрополь; 2016 г., Калининград; 2017 г., Нижний Новгород; 2017 г., Новосибирск (акт внедрения от 05.09.2017 г.). Результаты исследования используются в педагогическом процессе при чтении лекций и проведении практических занятий на курсах повышения квалификации для врачей-бактериологов филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» (акт внедрения от 16.10.2017 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 Пименовой А.С., 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 специальности 03.02.03 - микробиология.

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](http://www.antiplagiat.ru) показал, что оригинальный текст составляет 86,4 %.

Материалы исследования и основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на 7 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 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, 1 – в другом издании, 2 тезисов в рецензируемых изданиях, 3 – в материалах конференций и 2 патента на изобретение РФ.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета Д 208.046.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Согласие ведущей организации имеется.

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

- Маянский Николай Андреевич – доктор медицинских наук (14.00.36 - аллергология и иммунология), профессор РАН, заведующий лабораторным отделом Научно-исследовательского института педиатрии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации;
- Андреевская Софья Николаевна – кандидат медицинских наук (03.00.07 - микробиология), старший научный сотрудник отдела микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

Согласие официальных оппонентов имеется.

**Заключение:**

**комиссия Диссертационного совета Д 208.046.01 рекомендует диссертацию Пименовой Алены Сергеевны «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша» по специальности 03.02.03 - микробиология к приему к защите.**

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета Д 208.046.01:

**Председатель:**

Главный научный сотрудник  
лаборатории цитокинов ФБУН МНИИЭМ  
им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
доктор биологических наук, профессор

Н.Т. Тихонова

**Члены комиссии:**

Декан медико-профилактического факультета  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России (Сеченовский Университет),  
доктор медицинских наук, профессор

Ю.В. Несвижский

Директор ОАО «Институт инженерной иммунологии»  
доктор медицинских наук, профессор

С.Ю. Пчелинцев

Научный консультант ООО «НПО Петровакс Фарм»,  
доктор медицинских наук, профессор

А.В. Степанов