

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д.208.046.01 НА БАЗЕ 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 ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 09 июня 2016 г. № 3.

О присуждении Чагиной Ирине Алексеевне, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата медицинских наук.

Диссертация "Антибиотикочувствительность и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Corynebacterium diphtheriae*" по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 01.04.2015 г. протокол № 2 диссертационным советом Д.208.046.01 на базе 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 (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10). Диссертационный совет утверждён Приказом Министерства образования и науки РФ № 714/нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ №219/нк от 05.03.2015 г. част.изм.

Соискатель Чагина Ирина Алексеевна, 1984 года рождения. В 2010 году окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова" Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию по специальности медико-профилактическое дело. Работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций в 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. Диссертация выполнена в 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.

Научный руководитель – доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), Борисова Ольга Юрьевна, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций, руководитель лаборатории.

Официальные оппоненты: Быков Анатолий Сергеевич - доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор, Государственное бюджетное образовательное

учреждение высшего профессионального образования "Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, профессор кафедры; Тец Виктор Вениаминович - доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика Д.К. Заболотного, заведующий кафедрой – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва), в своем положительном заключении, подписанном Русаковой Екатериной Владимировной, доктором медицинских наук, профессором, ведущим научным сотрудником научного отдела, указала, что диссертация является работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи характеристики биологических и молекулярно-генетических свойств популяции штаммов *C. diphtheriae*. **Соискатель имеет** 27 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации – 14 работ, из них 5 работ опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 1 – в другом издании, 8 – в материалах конференций, общим объёмом 28,2 страниц и авторским вкладом – 23 страниц. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации: 1) Борисова, О.Ю. Мультилокусное секвенирование токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2002 - 2012 гг. / О.Ю. Борисова, И.К. Мазурова, И.А. Чагина, А.С. Пименова, Е.Е. Донских, В.А. Алешкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 4. - С. 17 - 23. 2) Чагина, И.А. Чувствительность штаммов *Corynebacterium diphtheriae* к антибактериальным препаратам / И.А. Чагина, О.Ю. Борисова, В.Г. Мельников, Г.А. Иващенко, А.С. Пименова, Е.Е. Донских, Л.И. Кафарская, В.А. Алешкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2014. - № 4. - С. 8 - 13. 3) Борисова, О.Ю. Особенности структуры гена *tox*, кодирующего дифтерийный токсин, штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных в России в 2010 – 2015 гг. / О.Ю. Борисова, И.А. Чагина, А.В. Чаплин, С.Ю. Комбарова, Л.И. Кафарская, В.А. Алешкин // Инфекционные болезни. - 2015. - Т. 13, № 3. - С. 12 - 17.

На диссертацию и автореферат поступило 4 положительных отзывов без замечаний от: 1) к.б.н., доцента Донских Е.Е., доцента кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России; 2) д.м.н., профессора Нарвской О.В., ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН НИИЭМ им. Пастера; 3) д.м.н. Червинец Ю.В., профессора кафедры микробиологии, вирусологии с курсом иммунологии ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России; 4) д.м.н., доцента Ковалишеной О.В., заместителя директора по науке НИИ профилактической медицины и профессора кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России. В отзывах отмечено, что полученные автором результаты исследования существенно расширили и дополнили научные знания о распространенности, с тенденцией к росту

антибиотикорезистентности, штаммов *C. diphtheriae* и молекулярных механизмах ее формирования, клональной организации популяции, закономерностях циркуляции штаммов, степени их филогенетического родства и эволюции возбудителя дифтерии. В результате впервые проведенного полноразмерного секвенирования получен драфтовый сиквенс генома мультирезистентного токсигенного штамма *C. diphtheriae*.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в области микробиологии и проведения молекулярно-генетических исследований, в том числе, посвящённой исследованиям возбудителей инфекционных и гнойно-воспалительных заболеваний, а также микробиоты различных эпителиев.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований научно обоснованы и разработаны предложения по совершенствованию микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за дифтерией, а именно, мониторинг антибиотикорезистентности с молекулярно-биологическим компонентом (определение генов антибиотикорезистентности к разным группам антимикробных препаратов), а также возможности использования мультилокусного секвенирования для генотипирования штаммов *C. diphtheriae* в целях прогнозирования тенденций эпидемического процесса. Обосновано и предложено использование мультилокусного секвенирования ДНК для характеристики популяция циркулирующих штаммов *C. diphtheriae* в России. Показаны взаимосвязи между фенотипическими свойствами (токсигенность и биовар) и принадлежностью штаммов *C. diphtheriae* к определенному сиквенс-типу. Установлено, что 5,6% штаммов *C. diphtheriae* являются резистентными к пенициллинам, 3,6 – 3,7% к макролидам и 4,7% - к рифампицину; множественной резистентностью обладают 3,8% штаммов. Доказаны молекулярные механизмы резистентности штаммов *C. diphtheriae* к макролидам, обусловленные наличием гена *erm(X)*, расположенного на плазмиде; и к рифампицину - в наличии мутаций в трех позициях гена *groV*, затрагивающих кодоны аминокислот в β субъединице РНК-полимеразы. В результате впервые проведенного полноразмерного секвенирования введены данные о геноме мультирезистентного токсигенного штамма *C. diphtheriae*, нуклеотидная последовательность которого депонирована в международную базу данных GenBank (JZUJ00000000.1).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказаны закономерности циркуляции штаммов *C. diphtheriae* и данные об их антибиотикочувствительности, которые дополняют знания о биологических свойствах возбудителя дифтерии и расширяют представления о молекулярных механизмах, обуславливающих резистентность у возбудителей инфекционных заболеваний, подтверждающих возможность передачи генетической информации между микроорганизмами в одном биотопе макроорганизма.

Применительно к проблематике диссертации, результативно использован комплекс микробиологических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов исследования, позволивших охарактеризовать современную популяцию штаммов *C. diphtheriae*. В данном исследовании изложены подходы для дальнейшего изучения биологических свойств *C. diphtheriae*, которые позволят охарактеризовать состав и

особенности циркулирующей популяции, ее гетерогенность и филогенетическое родство. Раскрыт 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. 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*. Изучены особенности структуры генов *tox* и *dtxR* у современных токсигенных штаммов *C.diphtheriae*, выделенных в 2010-2015 гг. Впервые показаны мутации в позиции (-19) в промоторной области и позиции A305T в T домене В субъединицы дифтерийного токсина; новая мутация в позиции (-23) промоторной области и ранее описанные мутации в двух позициях гена *dtxR*, что подтверждает нарастание у современных штаммов *C.diphtheriae* полиморфизма в генах, кодирующих дифтерийный токсин и регуляторный DtxR белок. Проведена модернизация методов наблюдения за возбудителем дифтерийной инфекции на основе использования мультилокусного секвенирования ДНК.

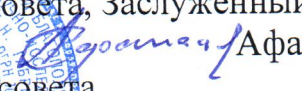

Значение, полученных соискателем результатов исследования для практики, подтверждается тем, что разработаны методические подходы для сравнительного изучения молекулярно-генетических свойств штаммов *C.diphtheriae*, которые внедрены в работу референс-центра по мониторингу возбудителей кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и ФБУЗ ЦГиЭ в г. Москве (акты внедрения от 28.01.2016 г. и 02.02.2016 г.), а также были использованы для подготовки информационно-методического Письма Роспотребнадзора от 16.12.2015 № 01/15524-15-27. 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. 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 резистентности к антибактериальным препаратам. 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 при лабораторной диагностике дифтерийной инфекции, для генотипирования *C.diphtheriae* при проведении молекулярно-генетического мониторинга возбудителя дифтерийной инфекции и изучения антибиотикорезистентности (справки о депонировании В-7390, В-7389, В-7388, В-7387, В-4398, В-7391, В-7813, В-7815, В-7817, В-7816, В-7819, В-7818, В-7820). Данные о мультирезистентном токсигенном штамме *C.diphtheriae* и его геноме представлены в международную базу данных генотипов и доступны для использования при сравнительно-геномных исследованиях молекулярно -

генетических особенностей *C.diphtheriae*. Результаты микробиологического и молекулярно-генетического мониторинга штаммов *C.diphtheriae* представлены на 10 совещаниях с практическими семинарами по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша для бактериологов различных федеральных округов России.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что исследование основано на большом объёме материала и проведено на высоком научно-методическом уровне с применением классических и современных молекулярно-генетических методов, современных стандартов и подходов к обработке биоинформационных данных, а также сертифицированного оборудования. Бактериологическими и молекулярно-генетическими методами было исследовано 912 штаммов *C.diphtheriae*. Теория построена на основе существующих представлений о генетическом разнообразии бактерий и согласуется с наблюдаемыми в геномных последовательностях закономерностями. Идея базируется на отечественных и мировых научно-исследовательских данных микробиологических и молекулярно-генетических исследований *C.diphtheriae*. Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по проблеме дифтерии. Установлено, что большинство результатов исследования согласуется с результатами других авторов, представленных в независимых источниках по проблеме изучения биологических свойств *C.diphtheriae*. Используются сертифицированные методы исследования и описательной статистики, компьютерные программы и международные информационные базы данных, а также современные методы анализа биологических последовательностей.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в проведении микробиологической части (сбор материала, культивирование на плотных питательных средах, изучение культурально-морфологических, токсигенных и биохимических свойств, определение чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам), молекулярно-генетической части (выделение ДНК, конструирование праймеров, проведение ПЦР, интерпретация результатов секвенирования и филогенетический анализ). Полногеномное секвенирование и анализ сиквенса проведен совместно с к.м.н. А.Н. Шкопоровым, А.В. Чаплиным, д.м.н., профессором Б.А. Ефимовым и д.м.н., профессором Л.И. Кафарской на кафедре микробиологии и вирусологии педиатрического факультета ГОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

На заседании 09 июня 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Чагиной И.А. учёную степень кандидата медицинских наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 14 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Зам председателя диссертационного совета, Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор  Афанасьев Станислав Степанович
Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук  Борисова Ольга Юрьевна
09 июня 2016 г.

