

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 ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 05 апреля 2018 г. № 3.

О присуждении Пименовой Алене Сергеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 01.02 2018 г., протокол № 3 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, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10). Диссертационный совет утвержден Приказом Министерства образования и науки РФ № 714 / нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ № 1577 / нк от 16.12.2016 г. част. изм.

Соискатель Пименова Алена Сергеевна, 1985 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». С 2012 года по настоящее время 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), доцент 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.

Официальные оппоненты: Маянский Николай Андреевич – доктор медицинских наук (14.00.36 - аллергология и иммунология), профессор РАН, Научно-исследовательский

институт педиатрии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лабораторный отдел, заведующий; Андреевская Софья Николаевна – кандидат медицинских наук (03.00.07 - микробиология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», отдел микробиологии, старший научный сотрудник – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва) в своем положительном заключении, подписанном Каратаевым Геннадием Ивановичем, доктором биологических наук, лаборатория генетики бактерий, руководитель, указала, что диссертация является работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи – совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша, основанных на технологиях амплификации нуклеиновых кислот. Предложенные способы позволят проводить генодиагностику этих инфекций при обследовании больных и контактных в очагах и выявлять потенциально опасных носителей инфекции.

Соискатель имеет 29 опубликованных работ, в том числе 11 работ по теме диссертации, из них 3 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 1 – в другом издании, 5 – в материалах конференций и 2 патента на изобретение РФ, общим объемом 66 страниц и авторским вкладом – 40 страниц. Наиболее значимые работы: 1) Пименова, А.С. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции / А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, О.В. Цвиркун, А.А. Басов, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Е.Е. Донских, А.П. Пикина, Л.И. Кафарская, М.С. Афанасьев, А.В. Караулов // Инфекция и иммунитет. - 2017. - Т. 7, № 2. - С. 162-170; 2) Борисова, О.Ю. Ускоренный способ генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя / О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.В. Чаплин, Л.И. Кафарская, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, А.В. Алешкин, М.С. Афанасьев, А.В. Караулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2017. - № 5. - С. 24-32; 3) Патент 2542396 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/569. Способ и набор для ускоренной лабораторной диагностики коклюшной инфекции / О.Ю. Борисова, А.С. Пименова, А.В. Алешкин, М.С. Петрова, В.А. Алешкин; заявитель и патентообладатель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. - № 2013149234/15; заявл. 06.11.2013; опубл. 20.02.2015, Бюл. № 5. - 8 с.

На диссертацию и автореферат поступило 4 положительных отзыва без замечаний от: 1) д.б.н., доцента Заславской М.И., профессора кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; 2) д.м.н., доцента Малышева В.В., профессора кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России; 3) д.м.н., доцента Червинец Ю.В., профессора кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинский университет» Минздрава России); 4) к.м.н. Вечерковской М.Ф., доцента кафедры микробиологии и

вирусологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России. В отзывах отмечено, что в ходе диссертационного исследования были разработаны метод идентификации возбудителя дифтерии на основе LAMP-технологии и способ выявления и дифференциации ДНК токсигенных, нетоксигенных и нетоксигенных токснесущих *C.diphtheriae* и токсигенных *C.ulcerans* методом ПЦР в формате мультиплекс в двух вариациях, и определены их аналитические характеристики. Оптимизирован способ выявления ДНК *B.pertussis* в биологическом материале методом LAMP и проведена оценка его валидности.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в изучении патогенных для человека микроорганизмов и способов их идентификации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработаны методы генодиагностики возбудителей дифтерии и коклюша на основе технологий амплификации нуклеиновых кислот – изотермической амплификации и мультиплекс-ПЦР, и определены их аналитические характеристики. Предложена новая комбинация ДНК-мишеней (нуклеотидные последовательности генов дифтерийного токсина, репрессора дифтерийного токсина, амилазы и РНК-полимеразы), благодаря которой в мультиплекс-ПЦР выявляются генетические детерминанты, определяющие токсигенность и биотип возбудителя дифтерии и позволяющие дифференцировать *C.diphtheriae* от других клинически значимых представителей рода *Corynebacterium*. Доказана высокая эффективность выявления ДНК возбудителя дифтерии методом LAMP и ПЦР-мультиплекс (аналитические чувствительность $2,3 \times 10^3$ ГЭ/мл, специфичность 100%); высокая эффективность выявления ДНК *B.pertussis* в биологическом материале методом LAMP (диагностические чувствительность 99,6 %, специфичность 98,7 %, индекс точности 99,4 %). Введены представления о распространенности возбудителя коклюша в эпидемических очагах и организованных коллективах с длительно кашляющими детьми, и бактерионосителей в семейных очагах.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказана необходимость обследования контактных лиц в очагах с помощью методов генодиагностики с целью своевременного выявления не только больных, но и бактерионосителей, которым на современном этапе эпидемического процесса отводится ведущая роль в распространении этих инфекций. Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс микробиологических и современных молекулярно-генетических методов исследования, которые позволили наработать доказательную базу для проведения адекватной оценки возможностей применения в клинических условиях разработанных способов идентификации возбудителей дифтерии и коклюша. Изложены данные о валидности диагностического теста по выявлению ДНК *B.pertussis* в биологическом материале методом LAMP, а также аналитической надежности разработанных методов генодиагностики возбудителей дифтерии и коклюша. Раскрыты возможности использования разработанного метода генодиагностики возбудителя коклюша на основе LAMP-технологии при обследовании больных коклюшем с различными формами

клинического течения, на разных сроках болезни и на фоне антибиотикотерапии, особенно у детей до 1 года; и разработанных способов генодиагностики возбудителя дифтерии при обследовании с диагностической и профилактической целью. Изучены возможности использования метода генодиагностики возбудителя коклюша при выявлении больных на разных стадиях течения инфекционного процесса и бактерионосителей в организованных детских коллективах с установленным и не установленным источником инфекции. Установлено, что в семейных очагах выявлено 47,5 % больных стертыми и легкими формами коклюша и 27,5 % бактерионосителей. Проведена модернизация метода генодиагностики возбудителя коклюша на основе изотермической амплификации (LAMP), что позволило сократить продолжительность исследования и повысить чувствительность до 99,6 %.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанные автором методы генодиагностики возбудителей дифтерии и коклюша внедрены в работу Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора при проведении мониторинга популяций штаммов *B.pertussis* и *C.diphtheriae* (акт внедрения от 05.09.2017 г.). Материалы диссертации используются на курсах повышения квалификации в ФБУЗ ЦГиЭ в городе Москве (акт внедрения от 16.10.2017 г.). Определены перспективы использования предложенного диагностического теста для выявления ДНК возбудителя коклюша методом LAMP и разработанных способов идентификации возбудителя дифтерии методом LAMP и мультиплекс-ПЦР в системе практического здравоохранения. Создана рабочая коллекция образцов ДНК микроорганизмов рода *Corynebacterium* и рода *Bordetella*, которая будет использована в дальнейших исследованиях в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора по изучению их внутривидового и межвидового генетического полиморфизма с последующей оценкой родственных связей и уточнением вопросов филогении. Представлен алгоритм проведения лабораторного исследования на дифтерийную инфекцию с внедрением молекулярно-генетических методов для обнаружения возбудителя в клиническом материале при обследовании с диагностической и профилактическими целями.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что объем выборки изученных штаммов микроорганизмов и образцов клинического материала является достаточным, методы статистической обработки подобраны адекватно, эксперименты проведены на высоком научно-методическом уровне с применением микробиологических и современных молекулярно-генетических методов и использованием сертифицированного оборудования, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях. В ходе выполнения диссертационной работы изучено 409 штаммов, выделенных от пациентов с подозрением на коклюш и дифтерию, и 159 штаммов, выделенных от больных с тонзиллярной патологией и патологией полости носа. Исследовано 809 образцов биологического материала, полученных от больных коклюшем и от контактных из эпидемических очагов коклюшной инфекции и организованных коллективов с длительно кашляющими детьми. Выполнено 567 бактериологических, 159 масс-спектрометрических и 4696 молекулярно-генетических исследований. Теория исследования построена на

известных данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по разработке и применению методов амплификации нуклеиновых кислот. Идея базируется на отечественных и мировых данных микробиологических и молекулярно-генетических исследований в области диагностики коклюша и дифтерии. Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по проблеме генодиагностики возбудителей воздушно-капельных инфекций. Установлено, что большинство результатов исследования согласуется с результатами других авторов, представленными в независимых источниках по лабораторной диагностике коклюша и дифтерии. Используются сертифицированные методы исследования и описательной статистики, специальные компьютерные программы и международные общедоступные базы данных.

Личное участие соискателя заключалось в выполнении всех микробиологических и молекулярно-генетических исследований. Самостоятельно проведен анализ полученных данных, их статистическая обработка и обобщение результатов. Подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров для идентификации *C.diphtheriae* методом мультиплекс-ПЦР проведен совместно с заведующим лабораторией молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ, к.б.н. Воложанцевым Н.В. Масс-спектрометрические исследования, конструирование праймеров для идентификации *C.diphtheriae* ПЦР в формате мультиплекс и методом LAMP выполнены совместно с д.м.н., профессором Ефимовым Б.А., к.м.н. Чаплиным А.В. и д.м.н., профессором Кафарской Л.И. на кафедре микробиологии и вирусологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Апробация разработанного метода лабораторной диагностики коклюша проведена на базе ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ» совместно с врачами-инфекционистами клинического отдела ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора – к.м.н. Петровой М.С., д.м.н. Поповой О.П. и Вороновой И.С. Серологические исследования выполнены совместно со с.н.с. лаборатории кокковых инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора к.м.н. Скирдой Т.А. Апробация разработанного метода в очагах коклюшной инфекции выполнена совместно с эпидемиологами лаборатории профилактики кори и коклюша ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора – д.м.н. Цвиркун О.В. и к.м.н. Басовым А.А. Обследование больных с тонзиллярной патологией проводилось на базе ГБУЗ НИКИО им. Л.И. Свержевского ДЗМ совместно с д.м.н. Гуровым А.В. и к.м.н. Товмасын А.С.

На заседании 05 апреля 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Пименовой Алене Сергеевне ученую степень кандидата медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 11 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Зам.председателя диссертационного совета, Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор  Афанасьев Станислав Степанович
Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент  Борисова Ольга Юрьевна
05.04.2018 г.

