

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Макаровой Марины Витальевны на диссертационную работу Андриевской Ирины Юрьевны на тему: «Характеристика популяции *B. pertussis*, циркулирующей на территории Российской Федерации в 2018 – 2024 гг.», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11-микробиология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Коклюш – высококонтагиозное респираторное заболевание, возбудителем которого является *Bordetella pertussis*, представляет угрозу для жизни младенцев в возрасте до трёх месяцев, а также может протекать в тяжёлой форме у беременных женщин и пожилых людей. Наиболее эффективным методом профилактики и борьбы с коклюшем является иммунизация. Введение вакцинации в 1950-х годах значительно снизило заболеваемость коклюшем. Однако в последние десятилетия в ряде стран, несмотря на высокий уровень охвата вакцинацией населения, наблюдается всплеск заболеваемости коклюшем, что представляет собой глобальную проблему общественного здравоохранения. Так, в России в 2023 году зарегистрировано 52 727 случаев коклюша (36,1 на 100 тыс.), что существенно превысило показатели предыдущих лет. Возможные причины роста заболеваемости коклюшем: увеличение числа отказов родителей от вакцинации детей в возрасте до одного года; накопление неиммунных лиц среди детей старших возрастных групп; потеря специфического иммунитета среди взрослого населения; распространение *B. pertussis* бессимптомными носителями; переход с цельноклеточных вакцин на менее эффективные бесклеточные и адаптацию патогенов под действием селективного давления вакцинации, следствием чего, по-видимому, является эволюция *B. pertussis* в сторону всё большего ускользания от вакцины со всеми вытекающими отсюда проблемами. Несмотря на то, что выделение культуры *B. pertussis* из носоглоточного секрета является золотым стандартом диагностики коклюша, клиническое применение его ограничено из-за низкой чувствительности метода. Напротив, молекулярно-

генетические методы, благодаря своей чувствительности и специфичности, способствуют выявлению большего количества случаев инфекции, протекающих в легкой или стёртой форме, а также среди контактных лиц в очагах заболевания коклюшем.

Применение современных молекулярно-генетических методов также значительно расширило возможности эпидемиологического надзора и мониторинга за коклюшем. Однако, используемые в мире технологии для генотипирования *B. pertussis* основаны на использовании выделенной культуры возбудителя.

В этой связи диссертационное исследование Андриевской Ирины Юрьевны, направленное на изучение клонального состава циркулирующей популяции возбудителя коклюшной инфекции и разработку новых способов генотипирования *B. pertussis* непосредственно из клинического образца, полученного от больного, исключая этап выделения чистой культуры, позволяющих получать информацию о генотипических свойствах возбудителя, безусловно является актуальным.

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

В результате проведенных исследований автором Андриевской Ириной Юрьевной получены результаты с высокой степенью новизны: многофакторный анализ лабораторной диагностики коклюша на территории РФ за период 2018 – 2024 гг позволил установить этиологическую структуру возбудителей с доминированием *B. pertussis* (73,7%), чувствительных к эритромицину, кларитромицину, азитромицину и рокситромицину. Автором предложен новый, не использовавшийся ранее, способ генотипирования *B. pertussis* на основе вложенной (nested) ПЦР по определению аллельных профилей промотора *ptxP* гена коклюшного токсина, гена пертактина *prn* и гена фимбриального белка 3 типа *fim3* непосредственно из клинических образцов при проведении мониторинга за возбудителем коклюша. Впервые описана современная популяция *B. pertussis* по структуре 17 генов факторов патогенности, в 9 из которых выявлен однонуклеотидный полиморфизм.

Установлено, что в настоящее время сохраняются генотипические различия между штаммами *B. pertussis*, используемыми для производства вакцинного коклюшного компонента, входящего в состав АКДС, и циркулирующей популяцией *B. pertussis*. Впервые с помощью полногеномного секвенирования дана характеристика восьми штаммам *B. pertussis*, которые предложены в качестве перспективных штаммов для включения в кандидаты при производстве вакцинных препаратов.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Должная высокая степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Андриевской Ирины Юрьевны основана на использовании целесообразных, в соответствии с поставленными задачами, современных и адекватных методов: микробиологических, молекулярно-биологических, биоинформатических, на достаточном количестве исследованных биологических образцов (бактериальных культур *B. pertussis* и образцов диагностического материала, выделенного от пациентов с диагнозом коклюш). Выводы представленного исследования соответствуют поставленным задачам и подтверждены результатами исследования. Диссертация Андриевской Ирины Юрьевны выполнена согласно отраслевой научно-исследовательской программе «Проблемно ориентированные научные исследования в отрасли эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» в процессе выполнения задач НИР ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского: «Изучение роли инфекций, вызванных различными видами бордетелл и коринебактерий, в эпидемическом процессе дифтерийной и коклюшной инфекций в Российской Федерации» (Рег. № 1022040800551-4) на 2021 – 2025 гг., а также в процессе деятельности Референс-центра по мониторингу за коклюшем при проведении микробиологического мониторинга возбудителя коклюша на территории России в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга,

лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Результаты, полученные Андриевской Ириной Юрьевной, имеют существенное теоретическое и практическое значение. Так, определены подходы к проведению геномного эпидемиологического мониторинга *B. pertussis* для выявления тенденций внутривидовых генетических различий в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ. Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о продолжающейся микроэволюции возбудителя коклюша и формируют представления о масштабах внутривидового генетического разнообразия *B. pertussis*.

Установлено, что интенсивное использование метода ПЦР в лабораторной диагностике коклюша позволило увеличить долю лабораторно подтвержденных диагнозов и повысить количество положительных находок при обследовании в очагах инфекции, что послужило основанием для подачи предложения в новую редакцию СанПин о включении ПЦР- диагностики при обследовании в очагах.

Проведенные исследования по оценке антибиотикочувствительности штаммов *B. pertussis*, выделенных в период высокой заболеваемости коклюшем, к эритромицину, кларитромицину, азитромицину и рокситромицину указывают на возможное снижение эффективности указанных антибактериальных средств в отношении возбудителя коклюша *in vitro*.

Разработанный способ генотипирования *B. pertussis* непосредственно в клиническом материале позволяет оценить генетическое разнообразие циркулирующей популяции возбудителя. Это обеспечивает быстрое выявление *B. pertussis* с измененной структурой промотора гена коклюшного токсина, гена фимбриального белка 3 типа и гена белка пертактина в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ.

Автором предложен алгоритм микробиологического мониторинга *B. pertussis* в зависимости вида биоматериала – из клинического материала

осуществляется выделение ДНК, nested PCR и секвенирование по Сэнгеру, из бактериальной культуры осуществляется выделение ДНК и полногеномное секвенирование (WGS) с последующим проведением биоинформатического анализа для определения генетических характеристик, поиска мутаций, приводящих к устойчивости к антибактериальным препаратам, что в итоге позволит отслеживать адаптацию возбудителя к вакцинам и своевременно менять их штаммовый состав.

Создана и охарактеризована рабочая коллекция *B. pertussis* в количестве 222 штаммов, которая используется в научных целях и в качестве источника контрольных образцов для проведения внешнего контроля качества.

Полученные последовательности геномов 107 изолятов *B. pertussis* отправлены в Национальный каталог патогенных микроорганизмов «Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии» г. Оболенска, в процессе реализации федерального проекта «Санитарный щит страны – обеспечение биологической безопасности (профилактика, выявление, реагирование)».

500 нуклеотидных последовательностей фрагментов промотора *ptxP* гена коклюшного токсина и гена *fim3* *B. pertussis* депонированы на отечественной платформе агрегирования результатов расшифровок геномов возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний VGARus (genomenvpn.crie.ru).

Перспективные штаммы *B. pertussis* для включения в состав кандидатов производственных вакцинных штаммов переданы в «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» г. Москвы. Полученные результаты оценки эффективности лабораторной диагностики коклюша вошли в Государственные доклады «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году» и «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2024 году», а также в учебное пособие «Коклюш, дифтерия, столбняк: лабораторная диагностика и вакцинация», 2024 г. В процессе осуществления деятельности Референс-центра по мониторингу за коклюшем ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора результаты,

полученные в ходе диссертационного исследования, послужили основой для подготовки информационно-методических писем Роспотребнадзора «О заболеваемости коклюшем, анализе состояния лабораторной диагностики, мониторинге за возбудителем и состоянии противококлюшного иммунитета населения в Российской Федерации» от 19.11.2024 г. № 02/20325-2024-27 и от 16.06.2025 г. № 02/11250-2025-27; были использованы при составлении ежемесячных отчетов в соответствии с «Положением об эпидемиологическом мониторинге» № 02/20475-2023-27 от 29.11.2023 г.; и интегрированы в учебные материалы лекционного курса, применяемого на региональных практических семинарах по лабораторной диагностике дифтерии и коклюша (г. Ижевск, г. Казань, 2023 г.; г. Ярославль, г. Смоленск, 2024 г., г. Тюмень, г. Петропавловск-Камчатский, 2025 г.), а также на пяти онлайн-семинарах по лабораторной диагностике коклюша для специалистов Центрального, Приволжского и Уральского федеральных округов (2024 г.), Ханты-Мансийского автономного округа (2025 г.) (акт внедрения от 11.04.2025 г.).

Материалы диссертационного исследования используются в работе кафедры микробиологии и вирусологии Института профилактической медицины имени З. П. Соловьева ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России (акт внедрения: от 11.04.2025 года) и кафедры микробиологии им. В.С. Киктенко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (акт внедрения: от 14.04.2025 года) при обучении студентов.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Диссертационная работа была апробирована на заседании секции Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных заболеваний» (протокол № 2 от 24.04.2025 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 9 научных конференциях: XVI Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского к 300-летию

Российской академии наук, (Москва, 2024); Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024» (Москва, 2024); X Межведомственной научно-практической конференция «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика» (Москва, 2024); X Юбилейном конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Санкт-Петербург, 2024); VIII Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2024); IX Национальном конгрессе бактериологов, посвященном 50-летию ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора (Москва, 2024); XVII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (конгресс с международным участием) (Москва, 2025), XI Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням, посвященном 80-й годовщине Победы в Великой Отечественной войне 1941-1945 гг. (Санкт-Петербург, 2025), XI Межведомственной научно-практической конференции «Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика» (Москва, 2025). Основное содержание работы отражено в 17 печатных работах, из них 6 – в рецензируемых научных изданиях, в 1 патенте на изобретение и 1 учебном пособии.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Текст диссертационного исследования Андриевской Ирины Юрьевны изложен на 157 страницах машинописного текста и имеет стандартную структуру: введение, обзор литературы, 5 глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 40 рисунками. Список литературы включает 254 источника, в том числе 44 - отечественных и 210 - зарубежных авторов.

Во введении автор отразила все необходимые позиции, предъявляемые к законченным диссертационным исследованиям: актуальность, степень разработанности темы, цель, задачи, научную новизну, теоретическую и

практическую значимость, методологию и методы исследования, материалы и объект исследования. Раздел написан четко и свидетельствует о понимании автором проблемы и задач, поставленных для решения. Учитывая огромный объем исследования и разнообразие методологических подходов, важно было отметить личное участие Андриевской Ирины Юрьевны в работе, которое свидетельствует о высокой, основной степени участия в проведении работ и написании диссертации. В завершении раздела «Введение» логично сформулированы три положения, выносимые на защиту, а также степень достоверности и апробация результатов. Глава 1 представляет обзор литературных данных, посвященных возбудителю коклюшной инфекции. Обзор включает современные представления о коклюшной инфекции, мониторинге антибиотикочувствительности *B. pertussis*, геномном мониторинге в РФ и в мире. Обзор написан четко, раскрывает актуальность темы и затрагивает нерешенные проблемы в этой области, приведено много новых данных. Собственные результаты изложены в пяти главах. Глава 2 посвящена анализу лабораторной диагностики и этиологической структуры возбудителя коклюша в России в 2018 – 2024 гг. Проведена огромная работа, результаты которой сведены в 12 рисунков. Шаг за шагом Андриевская Ирина Юрьевна проводит анализ трех методов лабораторной диагностики коклюшной инфекции: бактериологического, молекулярно-генетического и серологического на территории РФ. На основании полученных в этом разделе результатов был сформулирован первый вывод. Глава 3 собственных результатов посвящена изучению антибиотикочувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis*, включает 3 подглавы, результаты отображены в 1 таблице и 6 рисунках. Автором проведены исследования по оценке чувствительности штаммов *B. pertussis* к антибактериальным препаратам группы макролидов бактериологическими и молекулярно-генетическими методами, результаты которых легли в основу второго вывода, адекватность которого не вызывает сомнения. Глава 4 собственных результатов посвящена разработке методики генодиагностики *B. pertussis* на основе вложенной ПЦР, результаты отображены в 1 таблице и 7 рисунках.

Проведанные исследования показали, что использование разработанного способа генотипирования *B. pertussis* на основе nested-ПЦР позволяет наработать целевые фрагменты, которые подвергают генотипированию с целью идентификации аллельных вариантов фрагментов промотора *ptxP* коклюшного токсина, фимбрий 3 типа *fim3* и пертактина *prn*. На основании полученных в этом разделе результатов был сформулирован вывод (3). На разработанный способ получен патент РФ. В главе 5 собственных результатов описывается клональный состав современной популяции *B.pertussis*, где выделены 3 подглавы, описывающие методический подход проведения геномного мониторинга циркулирующей популяции возбудителя коклюша, анализ генетической структуры *B.pertussis* в 2018-2024 гг и анализ изменений клонального состава. Результаты отображены в 2 таблицах и 9 рисунках. На основании полученных в этом разделе результатов был сформулирован один вывод (4). В главе 6 собственных результатов представлен сравнительный анализ производственных вакцинных штаммов и штаммов в кандидаты для производства вакцинных препаратов. Результаты отображены в 1 таблице и 1 рисунке. На основании полученных в этом разделе результатов были сформулированы два вывода (5,6). Шесть выводов, сформулированные Андриевской Ириной Юрьевной концентрируют полученные результаты, выделяют главное и полностью соответствуют проведенным исследованиям. Практические рекомендации, предложенные автором, безусловно могут быть поддержаны, поскольку непосредственно вытекают из материалов диссертации и имеют как теоретическую, так и практическую направленность.

Соответствие специальности

Совокупный анализ диссертационного исследования Андриевской Ирины Юрьевны на тему «Характеристика популяции *B. pertussis*, циркулирующей на территории Российской Федерации в 2018 – 2024 гг.» позволяет сделать вывод о соответствии работы специальности 1.5.11 – микробиология (биологические науки). Диссертация выполнена на актуальную тему, все поставленные задачи решены, выводы отражают основные результаты, имеющие теоретическую и практическую значимость для мониторинга возбудителя коклюша.

Автореферат диссертационного исследования Андриевской И.Ю. отражает содержание, результаты и выводы диссертационной работы в необходимом объеме, соответствует тексту диссертации, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами. Принципиальных замечаний по работе нет, имеются незначительные технические опечатки, которые не снижают общего положительного впечатления. В процессе ознакомления с диссертацией возник вопрос «Какие значимые изменения в геноме *B. pertussis* были выявлены в современной популяции, циркулирующей в России и как они влияют на вирулентность и иммуногенность возбудителя?».

Заключение

Диссертационная работа Андриевской Ирины Юрьевны на тему «Характеристика популяции *B. pertussis*, циркулирующей на территории Российской Федерации в 2018 – 2024 гг.», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология (биологические науки), выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Борисовой Ольги Юрьевны, является законченным трудом и содержит решение актуальной научной задачи – получение знаний об особенностях клонального состава *B. pertussis*, циркулирующих на территории России, с учетом критериев оценки генетической структуры и характеристики лекарственной устойчивости и создание нового способа генотипирования возбудителя коклюша непосредственно из клинического материала, что поможет решению задач современной медицины, связанных с эпидемиологией и терапией коклюша. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Андриевской Ирины Юрьевны отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 №

22.09.2025