

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, доцента Заславской Майи Исааковны 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

Недавний резкий подъем заболеваемости коклюшем заставил задуматься о потенциальном возвращении болезни, которая когда-то была одной из основных причин смерти детей. Рост заболеваемости коклюшем, особенно среди детей раннего возраста, а также случаи тяжёлого течения инфекции и летальные исходы подчеркнули значимость изучения возбудителя - *B. pertussis*.

Увеличение заболеваемости связывают с несколькими факторами: отказами от вакцинации в первые месяцы жизни, накоплением неиммунных детей старших возрастных групп, снижением иммунитета у взрослых, а также бессимптомным распространением инфекции и генетическими изменениями возбудителя под воздействием вакцинного давления. Важную роль сыграло и расширенное применение современных методов диагностики, таких как ПЦР, способствующих выявлению большого числа случаев — включая лёгкие и скрытые формы болезни.

Для профилактики коклюша в России с конца 1950-х годов используется комбинированная вакцина АКДС, в состав которой входит цельноклеточный убитый штамм *B. pertussis*, технологическая подготовка которого, как полагают, отражается на реактогенности препарата. Это стало стимулом для разработки бесклеточных вакцин с очищенными антигенами, внедренных в мировую практику в 1990-х годах. Однако, некоторые исследования указывают на связь между применением бесклеточных вакцин и ростом заболеваемости как следствие короткого, в данном случае,

поствакцинального иммунитета. Кроме того, в международной практике зафиксированы случаи устойчивости возбудителя к макролидам - одной из групп антибиотиков выбора при инфекции, что требует наблюдения за антибиотикорезистентностью.

Современные молекулярно-генетические технологии расширяют возможности эпидемиологического и лекарственного мониторинга коклюша. Однако существующие методы генотипирования предполагают культивирование чистых культур бактерий, что удлиняет сроки получения данных о генотипах циркулирующих штаммов. Поэтому актуальна разработка методик генотипирования *B. pertussis* напрямую из клинических образцов, что позволит оперативно оценивать клональный состав популяции возбудителя и улучшить контроль за инфекцией.

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

Проведенный многофакторный анализ состояния лабораторной диагностики коклюша на территории РФ позволил установить этиологическую структуру возбудителей с доминированием *B. pertussis* 73,7% за период 2018 – 2024 гг.

Установлено, что в период подъема заболеваемости коклюшем рост числа выявленных случаев происходил за счет интенсивного использования и лабораторного подтверждения диагноза с помощью молекулярно-генетических исследований

На территории РФ в популяции *B. pertussis* в период 2018–2024 гг. циркулировали штаммы, чувствительные к эритромицину, кларитромицину, азитромицину и рокситромицину, и отсутствовали штаммы с мутацией в позиции A2047G в 23S rRNA, определяющей резистентность к макролидам. В то же время, показано, что у штаммов *B. pertussis*, выделенных в 2023–2024 гг., отмечается снижение чувствительности к эритромицину и кларитромицину по сравнению со штаммами *B. pertussis*, выделенными в 2018 – 2020 гг.

Впервые разработан способ генотипирования *B. pertussis* на основе вложенной (nested) ПЦР по определению аллельных профилей промотора *ptxP* гена коклюшного

токсина, гена пертактина *ptn* и гена фимбриального белка 3 типа *fim3* из клинических образцов (Патент на изобретение РФ 2822353).

Впервые описана современная популяция *B. pertussis* по структуре 17 генов факторов патогенности (*ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE*, *ptxP*, *fim2*, *fim3*, *prn*, *tcfA*, *fhaB*, *cyuA*, *vag8*, *bapC*, *brkA*, *ompQ*, *bscI*) в 9 генах выявлен однонуклеотидный полиморфизм, что может влиять на вирулентность и иммуногенность возбудителя. В период высокой заболеваемости коклюшем 2023–2024 гг. отмечается доминирование двух генотипов с аллельными профилями *ptxP3/fim3-1/prn2* и *ptxP3/fim3-2/prn2*.

Установлено, что в настоящее время присутствуют 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

Достоверность полученных результатов подтверждается значительным количеством проведенных исследований (проанализировано 5652 образцов биологического материала и 222 штамма *B. pertussis*). В исследованиях применяли не только бактериологические, но и молекулярно-генетические подходы, которые обладают высокой чувствительностью и специфичностью, а также использовали специализированное программное обеспечение для биоинформатического и статистического анализа данных.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Определены подходы к проведению геномного эпидемиологического мониторинга *B. pertussis* для выявления тенденций внутривидовых генетических различий в рамках эпидемиологического надзора за биологическими рисками распространения коклюшной инфекции на территории РФ, что может быть

использовано как основа совершенствования лабораторной диагностики, создания иммунопрофилактических препаратов и коррекции терапии при этой инфекции.

Полученные в ходе настоящего исследования результаты свидетельствуют о продолжающейся микроэволюции возбудителя коклюша и формируют представления о масштабах внутривидового генетического разнообразия *B. pertussis*, затрагивающих генетические детерминанты 17 факторов патогенности.

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.

Разработанный алгоритм микробиологического мониторинга *B. pertussis* проводится с учетом 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.

Работа была 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».

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. 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 противокклюшного 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 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 (Пироговский университет) при обучении студентов (акт внедрения: от 11.04.2025 года); данные исследования используются в работе кафедры микробиологии им. В.С. Киктенко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» при обучении студентов (акт внедрения: от 14.04.2025 года).

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 девяти научных конференциях и конгрессах, в том числе и с международным участием. Результаты опубликованы в 17 печатных изданиях, из них 6 – в рецензируемых научных изданиях, 1 – в другом издании, 8 – в сборниках материалов конференций, 1 патент на изобретение, 1 учебное пособие.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Андриевской Ирины Юрьевны построена по общепринятому плану и включает: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, 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 сформулированы актуальность и степень разработанности темы, цель и задачи исследования, научная новизна, расписаны методология, материалы и методы исследования, отмечен личный вклад автора, степень достоверности и апробация результатов, а также основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы современные представления о коклюшной инфекции и его возбудителе *B. pertussis*, мониторинге антибиотикочувствительности *B. pertussis* к антибактериальным препаратам группы макролидов, геномном мониторинге *B. pertussis* в РФ и в мире.

Результаты собственных исследований поделены на пять глав. Первая - посвящена анализу лабораторной диагностики и этиологической структуры возбудителя коклюша в России в 2018 – 2024 гг. Вторая - посвящена антибиотикочувствительности циркулирующих штаммов *B. pertussis*, включает 3 подглавы, результаты которых отображены в 1 таблицах и 6 рисунках. Третья - посвящена разработке методики генодиагностики *B. pertussis* на основе вложенной

ПЦР. На разработанный способ получен патент РФ. Четвертая описывается клональный состав современной популяции *B. pertussis*, где выделяют 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. В пятой главе представлен сравнительный анализ производственных вакцинных штаммов и штаммов в кандидаты для производства вакцинных препаратов.

В заключении обобщены все полученные данные. Выводы объективно отражают суть представленных исследований и соответствуют поставленным задачам. Значимость полученных результатов работы отражена в практических рекомендациях.

Соответствие специальности

Диссертация, выполненная Андриевской Ириной Юрьевной соответствует специальности 1.5.11 – микробиология (биологические науки).

Принципиальных замечаний к работе нет.

В процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы:

1. В диссертации описываются три варианта методов: культуральный, серодиагностика и ПЦР. Для каждого пациента применяли какой-то один из методов или определенные сочетания методов?
2. Имеется ли существенное преимущество (чувствительность, специфичность, скорость получения результатов, экономичность) при какой-либо комбинации/сочетанном применении вышеуказанных методов?
3. Чем объясняется тот факт, что в 2021 году удельный вес использования бактериологического исследования по эпидпоказаниям был непропорционально мал по сравнению с другими годами исследования?
4. Каковы причины существенного увеличения удельного веса серологического исследования, проведенного по эпидпоказаниям в 2022 г, и заметно более редкого применения этого анализа в другие годы исследования?
5. С учетом тестов по определению МИК к макролидами можно ли говорить о достоверном (с точки зрения статистики) снижении чувствительности штаммов

B. pertussis, циркулирующих в РФ, к эритромицину и кларитромицину, или это только тенденция?

6. Какой, исходя из данных исследования, можно предложить оптимальный вариант/ алгоритм лекарственного мониторинга возбудителя коклюша?
7. В работе указано, что у 9 генов *B. pertussis* выявлен однонуклеотидный полиморфизм, что может влиять на вирулентность и иммуногенность возбудителя. Какие именно из исследованных генов ответственны за иммуногенность (т.е. кодируют синтез основных проективных антигенов)?
8. Нужно ли при рекомендации штамма в «вакцинные кандидаты» ориентироваться не только на гены иммуногенности, но и на гены вирулентности *B. pertussis*?
9. Для каких генов использовалось секвенирование по Сенгеру? Чем был вызван этот выбор генов?
10. Влияет ли аллелизм гена промотора коклюшного токсина не только на экспрессию синтеза белка, но и на финальную структуру молекулы самого токсина? Стоит ли ориентироваться на гены промотора токсина при рекомендации включения того или иного штамма в «вакцинные кандидаты»?

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), выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Борисовой Ольги Юрьевны, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи – изучение особенностей клонального состава циркулирующей популяции *B. pertussis*, создание нового способа генотипирования возбудителя коклюша непосредственно из клинического образца. 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 № 426, от 10.02.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 № 1382 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Андриевская Ирина Юрьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 603950, БОКС-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1
телефон +7 (920) 012-56-67

e-mail: maya.zaslav@gmail.com

доктор биологических наук, доцент



Заславская Майя Исааковна

«16» сентября 2025 г.

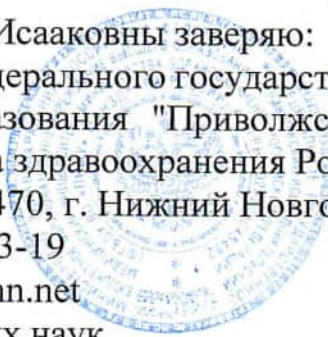
Подпись Заславской Майи Исааковны заверяю:

Ученый секретарь федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 603950, БОКС-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1
телефон: +7(831) 422-13-19

e-mail: uchsovet@pimunn.net

кандидат биологических наук



Сорокина Юлия Андреевна