

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 16 декабря 2016 г. №19
о присуждении Детушевой Елене Владимировне, гражданке РФ, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Моделирование биопленки у бактерий на плотной питательной
среде и изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану» по
специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 16.10.2016 г.,
протокол № 15 диссертационным советом Д 350.002.01 на базе Федерального
бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации,
142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, приказ о создании
№714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Детушева Елена Владимировна 1984 года рождения. В 2005 г.
окончила Воронежский Институт высоких технологий по специальности
«информационные системы и технологии». В 2008 г. окончила магистратуру
Пушкинского государственного университета по специальности «биология» с
присвоением степени магистра биологии, работает научным сотрудником отдела
коллекционных культур Федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека Российской Федерации. В 2014 г. окончила обучение в
очной аспирантуре Федерального бюджетного учреждения науки

«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по специальности 03.02.03. – «Микробиология».

Диссертация выполнена в отделе коллекционных культур Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научный руководитель - кандидат биологических наук Фурсова Надежда Константиновна, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, заведующая лабораторией антимикробных препаратов;

Научный консультант - академик РАН (постановление РАН № 47 от 28.10.2016 г.), доктор медицинских наук, профессор Дятлов Иван Алексеевич, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, директор.

Официальные оппоненты:

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии;

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации;

Федерации, заведующая лабораторией медицинской бактериологии, дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Нижний Новгород, в своем положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук, профессором Никифоровым Валерием Алексеевичем, заведующим лабораторией микробиологии, указала, что диссертация является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена научная задача: показана принципиальная возможность моделирования бактериальной биопленки на плотных питательных средах, изучен молекулярно-генетический механизм устойчивости к триклозану в мутантных штаммах стафилококков. Полученные результаты имеют существенное значение для современной клинической микробиологии и дезинфектологии. Диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства Российской Федерации 21.04.2016 г. № 335, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор представленной диссертации Детушева Е.В. заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология».

Соискатель имеет 11 научных работ, в том числе по теме диссертации 11, из них – 3 статьи в реферируемых журналах и 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских конференций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Родин, В.Б. Перекрестная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, сопряженная с резистентностью к дезинфектантам / В.Б. Родин, Е.Н. Кобзев, **Е.В. Детушева**, В.Н. Мартынова, Е.В. Тимошинова, К.В. Детушев, В.А. Чугунов, В.П.

Холоденко // **Дез. Дело.** – 2011. – № 3. – С. 102-114. ИФ ISI/РИНЦ – 0,207.
Цитирование РИНЦ – 11.

2. Кобзев, Е.Н. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы / Е.Н. Кобзев, В.А. Чугунов, В.Б. Родин, **Е.В. Детушева**, П.В. Слукин, Л.С. Федорова, В.Г. Акимкин // **Эпидемиол. Инф. Бол.** - 2014. – Т. 19. – №6. – С. 48-54. (Список ВАК до 30.11.2015 г.) ИФ ISI/РИНЦ – 0,237.

3. **Детушева, Е.В.** Чувствительность нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина / **Е.В. Детушева**, В.Б. Родин, П.В. Слукин, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, С.Ю. Сазыкина, И.А. Дятлов, Н.К. Фурсова // **Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.** – 2015. – Т. 17. – №1. – С. 57-66. (Список ВАК до 30.11.2015 г.) ИФ ISI/РИНЦ – 1,182.

На диссертацию и автореферат поступили положительные отзывы без замечаний от: (1) доктора медицинских наук Таран Татьяны Викторовны, заведующей лабораторией подготовки специалистов Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, г. Ставрополь; (2) доктора медицинских наук, профессора Шестопалова Николая Владимировича, директора Научно-исследовательского института дезинфектологии Роспотребнадзора, г. Москва; (3) кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Круглова Александра Николаевича, заведующего лабораторией микробиологии Национального агентства клинической фармакологии и фармации, г. Москва; (4) доктора биологических наук, доцента Михайловой Елены Алексеевны, заведующей кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Оренбургского государственного медицинского университета, и доктора медицинских наук, профессора Железнова Льва Михайловича, ученого секретаря того же университета.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук, профессор Мавзютов А.Р. является компетентным специалистом в сфере молекулярной микробиологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации

Детушевой Е.В. (Клин. Лаб. Диагн. – 2012. – № 3. – С. 40–42; 2015. – Т. 60. – № 12. – С. 56–59; Мед. Вестн. Башкорт. – 2012. – Т. 7. – № 1. – С. 63–65; 2016. – Т. 11. – № 2. – С. 19–23; Научн. Вестн. Белгород. Гос. Универ. Серия: Мед. Фарм. – 2012. – Т. 17. – № 4. – С. 26–31); доктор медицинских наук Краева Л.А. является специалистом в области микробиологии возбудителей инфекционных заболеваний и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Детушевой Е.В. (Инф. Иммуно. – 2012. – Т. 2. – № 4. – С. 729–734; Биотехносфера. – 2012. – Т. 19. – № 1. – С. 20–24; Нано. Микросист. Техн. – 2013. – № 12. – С. 19–33; Вестн. Санкт-Петербург. Универ. Серия 3. Биология. – 2013. – № 2. – С. 3–11).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения механизмов устойчивости бактерий к антимикробным препаратам, исследований ассоциаций бактерий в микробиоценозах организма человека, а также наличием публикаций в сфере исследований диссертации Детушевой Е.В. (Вестн. Нижегород. Универ. Лобачевск. – 2012. – № 2–3. – С. 20–24; Мед. Альм. – 2014. – Т. 34. – № 4. – С. 49–51; Рос. Журн. Гастроэнтерол. Гепатол. Колопроктол. – 2014. – Т. 24. – № 5 S44. – С. 25–26; Совр. Пробл. Наук. Образ. – 2015. – № 6. – С. 665; Справоч. Зав. КДЛ. – 2015. – № 11. – С. 33–41; Инф. Бол. – 2016. – Т. 14. – № 1. – С. 51–52; Генет. – 2016. – Т. 52. – № 9. – С. 1021–1028; Мед. Альм. – 2016. – Т. 43. – № 3. – С. 36–39).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан трехэтапный метод сравнительной оценки чувствительности к антисептикам бактериальных планктонных и биопленочных культур, включающий в себя: предварительную оценку диапазонов минимальных подавляющих концентраций (МПК) и минимальных бактерицидных концентраций (МБК), определение МПК и МБК методом микрокапли, определение МБК аппликативным методом;

предложена охарактеризованная рабочая коллекция госпитальных и коллекционных штаммов для использования при изучении у бактерий процессов биопленкообразования и формирования устойчивости к антисептикам;

доказана принципиальная возможность моделирования бактериальной биопленки на плотных питательных средах, что подтверждено визуализацией структуры биопленки на примере штамма *A. baumannii* В-1745 с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии, а также выявлением специфических белковых спектров методом масс-спектрометрии;

введены новые представления о том, что молекулярный механизм триклозан-устойчивости у стафилококков может быть связан с мутациями не только в гене *fabI*, кодирующем фермент еноил-ацил-редуктазу, но и в других генах, ассоциированных со структурами клеточной стенки и клеточным транспортом.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказана возможность моделирования биопленкообразования у бактерий при культивировании на плотных питательных средах, на микроскопическом уровне выявлены особенности морфологии бактериального газона, аналогичные структурам биопленок и макроколоний;

применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов) использован комплекс базовых методов - микробиологических (моделирование бактериальных биопленок на поверхности плотной питательной среды, оценка чувствительности бактерий к антисептикам, селекция триклозан-устойчивых вариантов бактерий); биофизических (получение белковых спектров штаммов с помощью масс-спектрометрии); молекулярно-генетических (полимеразная цепная реакция, секвенирование ДНК, полногеномное секвенирование); биоинформационных и статистических (анализ последовательностей амплифицированных ДНК-фрагментов и полных геномов бактерий, статистическая обработка результатов микробиологических экспериментов);

изложены сведения о различиях в чувствительности к антибактериальным препаратам планктонных и биопленочных культур госпитальных и референс-штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*;

раскрыты молекулярно-генетические механизмы высокой устойчивости к триклозану (64 мг/л) у двух мутантных вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 – *S. aureus* Tr1 и *S. aureus* Tr2 - наличие точечных мутаций в гене еноил-ацил-редуктазы *fabI* и в других генах, ассоциированных со структурами клеточной стенки и клеточным транспортом;

изучены уровни эффективности хлоргексидина против антибиотикорезистентных госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis*, выявлена устойчивость таких штаммов к данному антисептику в концентрациях, рекомендованных инструкциями по применению;

проведена модернизация метода оценки чувствительности микроорганизмов к антисептикам, позволяющая сравнивать уровни минимальных подавляющих и минимальных бактерицидных концентраций препаратов для планктонных клеток и для биопленок.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан и внедрен трехэтапный метод оценки чувствительности планктонных клеток и биопленок микроорганизмов к антисептикам (Методические рекомендации, Оболенск, 2016 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

определена эффективная концентрация хлоргексидина (1,5 %), использование которой в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов - возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (Акт внедрения НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко №1 от 06.04.2016 г.) – межведомственный уровень внедрения;

созданы и охарактеризованы четыре мутантных штамма *S. aureus* Tr1, *S. aureus* Tr2, *S. aureus* Tr1C и *S. aureus* Tr2C, устойчивых к высоким концентрациям триклозана, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (Справки о депонировании

№ 15 и № 16 от 18 марта 2016 г.; № 35 и № 36 от 27 мая 2016 г.) - федеральный уровень внедрения;

представлены в международной базе данных GenBank две последовательности мутантных генов еноил-ацил-редуктазы *fabI* (GenBank KP100447 и KP100446) с мутацией С284Т в штаммах *S. aureus* ATCC25923-Tr1 и ATCC25923-Tr2, устойчивых к 64 мг/л триклозана – международный уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты исследования получены в экспериментах с использованием сертифицированного оборудования и программного обеспечения; при этом применены современные микробиологические, биофизические, молекулярно-генетические методы, а также методы статистической обработки данных;

идея диссертационного исследования базируется на анализе имеющихся в литературе данных о появлении госпитальной флоры с множественной резистентностью к антибактериальным препаратам, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, обусловленной преимущественным существованием микрофлоры в виде биопленочных сообществ и микробных консорциумов, способных колонизировать организм пациента, а также адсорбироваться на инвазивных медицинских устройствах;

использовано сравнение авторских данных с опубликованными ранее в научной литературе относительно антимикробного действия различных концентраций хлоргексидина для инактивации госпитальных патогенов; изучения при помощи электронной микроскопии клеток *A. baumannii*, вовлеченных в процесс биопленкообразования; механизма формирования устойчивости клеток *S. aureus* к триклозану;

установлено совпадение авторских данных и данных, полученных ранее – обнаружение морфологических структур макроколоний бактерий, формируемых на плотных питательных средах, аналогичных структурам, обнаруживаемым в биопленках; выявление различий в белковых масс-спектрометрических спектрах

бактериальных клеток планктонных культур и биопленок; детекция точечных мутаций в гене еноил-ацил-редуктазы у триклозан-устойчивых штаммов *S. aureus*.

использованы современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в:

личном участии на всех этапах планирования и выполнения экспериментов; непосредственном участии в создании коллекции штаммов госпитальных патогенов для моделирования бактериальных биопленок при изучении устойчивости к антисептикам; в разработке метода оценки чувствительности планктонных клеток и биопленок бактерий к антисептикам; в определении чувствительности к антисептику хлоргексидину госпитальных штаммов, планктонных культур и биопленок, в определении концентрации хлоргексидина, эффективной в отношении современных штаммов госпитальных бактериальных патогенов; в селекции производного штамма *S. aureus* ATCC25923, устойчивого к антисептику триклозану, в характеристике его культурально-морфологических свойств; в определении мутаций штамма *S. aureus* ATCC25923 и его изогенных вариантов, устойчивых к триклозану, а также в подготовке научных публикаций по результатам исследований.

На заседании 16.12.2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Детушевой Е.В. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 17, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель

диссертационного совета _____ (Шемякин Игорь Георгиевич)

Ученый секретарь

диссертационного совета _____ (Коломбет Любовь Васильевна)

Дата оформления Заключения – 16 декабря 2016 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.