

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 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 16.12.2022 г. № 34

о присуждении Кузиной Екатерине Сергеевне, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Интегроны классов 1 и 2 в штаммах мультирезистентных грамотрицательных бактерий» по специальности 1.5.11. Микробиология принята к защите 14.10.2022 г., протокол № 27, диссертационным советом 64.1.002.01 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., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Кузина Екатерина Сергеевна, 1993 г. рождения, в 2015 г. окончила Биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Челябинский государственный университет» по специальности «Микробиолог-биолог». С 2015 по 2020 гг. Е.С. Кузина обучалась 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 направлению подготовки 1.5. – «Биологические науки», направленности 1.5.11. – «Микробиология»; работает в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав

потребителей и благополучия человека Российской Федерации, отдел подготовки и усовершенствования специалистов, научный сотрудник.

Диссертация выполнена в отделе подготовки и усовершенствования специалистов 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 (специальность 1.5.11. Микробиология) 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, лаборатория антимикробных препаратов, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Краева Людмила Александровна – доктор медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, лаборатория медицинской бактериологии, заведующая лабораторией.

Сухорукова Марина Витальевна – кандидат медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, лаборатория микробиологии и антибактериальной терапии, заведующий лабораторией.

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург, в своем положительном заключении, подписанном Сидоренко Сергеем

Владимировичем, членом-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук, профессором, научно-исследовательский отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, заведующий отделом, указала, что диссертационная работа Кузиной Екатерины Сергеевны на тему «Интегроны классов 1 и 2 в штаммах мультирезистентных грамотрицательных бактерий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с характеристикой и оценкой представленности интегронов классов 1 и 2 в штаммах клинически значимых мультирезистентных грамотрицательных бактерий, что важно для современной микробиологии и медицины. По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, 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 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Кузина Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология..

Соискатель имеет **29** опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **26** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **5** работ, 1 База данных и 20 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций. Общий объем работ – 6,1 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Fursova, N.K. The spread of *bla*_{OXA-48} and *bla*_{OXA-244} carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, A.I. Knyazeva, N.N. Kartsev, **E.S. Leonova***, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, N.V. Kurdyumova, S.Y.

Sazikina, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, I.A. Dyatlov // **Ann. Clin. Microb. Antimicrob.**-2015.-V.14, N1.-P.46. Scopus, SJR=0,88. Цит. 48.

2. **Кузина, Е.С.** Интегроны классов 1 и 2 в госпитальных штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг. / **Е.С. Кузина, Е.И. Асташкин, А.И. Лев, Е.Н. Агеева, Н.Н. Карцев, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова** // **Мол. Генетика Микробиол. Вирусол.** – 2019. – Т. 37, № 1. – С. 17-24. Scopus, SJR=0,25. Цит. 1.

3. **Kuzina, E.S.** Carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains in healthy microbiology laboratory staff, Russia / **E.S. Kuzina, T.S. Novikova, V.I. Solomentsev, A.A. Sizova, E.I. Astashkin, N.K. Fursova** // **Microbiol. Res. Announc.** – 2021. – Vol. 10, N 19. – P. e00349-21. Scopus, SJR = 0,303. Цит. 1.

4. Fursova, N.K. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing severe infections in the Neuro-ICU. / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, I.A. Savin, T. S. Novikova, G.N. Fedyukina, A.A. Kislichkina, M.V. Fursov, **E.S. Kuzina, S.F. Biketov, I.A. Dyatlov** // **Antibiotics.** – 2021. – Vol. 10, N 8. – P. 979. Scopus, SJR=0,785. Цит. 6.

5. **Kuzina, E.S.** Rectal and Tracheal Carriage of Carbapenemase Genes and Class 1 and 2 Integrins in Patients in Neurosurgery Intensive Care Unit. / **E.S. Kuzina, T.S. Novikova, E.I. Astashkin, G.N. Fedyukina, A.A. Kislichkina, N.V. Kurdyumova, I.A. Savin, O.N. Ershova, N.K. Fursova** // **Antibiotics.** – 2022. – Vol. 11, N 7. – P. 886. Scopus, SJR=0,785. Цит. 0.

Примечание: *Леонова - фамилия Кузиной Е.С. до 01.11.2018 г.

На диссертацию и автореферат поступило **6** положительных отзывов без замечаний от: **(1)** канд. биол. наук **Андреевой Светланы Владимировны**, доцента кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, г. Челябинск; **(2)** д-ра биол. наук, доцента **Соловьевой Ирины Владленовны**, ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией микробиома человека и средств его коррекции Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, г. Нижний Новгород; **(3)** д-ра мед. наук **Багировой Наталии Сергеевны**, старшего науч. сотрудника микробиологической лаборатории Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина, г. Москва; **(4)** д-ра биол. наук, доцента **Стояновой Лидии Григорьевны**, вед.

науч. сотрудника кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва; **(5)** канд. биол. наук **Гончарова Руслана Георгиевича**, научного сотрудника лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, г. Пушкино; **(6)** академика РАН, д-ра биол. наук, профессора Егорова Алексея Михайловича, главного научного сотрудника кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук **Краева Людмила Александровна** является признанным специалистом в области микробиологии, связанной с изучением устойчивости бактерий к антимикробным препаратам и формирования механизмов их резистентности, и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кузиной Е.С. (**Инф. Иммунол.** - 2020. - Т. 10, № 1. - С. 121-128; **Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.** - 2020. - Т. 22, № 3. - С. 231-236; **Пат. RU2761096 C2**, 03.12.2021 г.; **Вестн. Центр. Научно-исслед. Инс. Туб.** - 2021. - № S1. - С. 227-228; **Инф. Иммунол.** - 2021. - Т. 11, № 5. - С. 965-972; **Св. о рег. баз данных** № 2021622085 от 05.10.2021, № 2021621695 от 10.08.2021; **Инф. Бол.** - 2021. - Т. 19, № 3. - С. 85-91; **Вестн. Гематол.** - 2022. - Т. 18, № 1. - С. 48; **Pharmaceutics.** - 2022. - V. 14. – P. 1186; **Иммунопатол. Аллергол. Инфектол.** - 2022. - № 1. - С. 25-31; **Mol. Divers.** – 2022);

кандидат медицинских наук **Сухорукова Марина Витальевна** является специалистом в области медицинской микробиологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кузиной Е.С. (**Can. J. Inf. Dis. Med. Microbiol.** - 2017. V. 2017. - P. 1839190; **Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.** - 2017. - Т. 19, № 1. - С. 49-56; 2017. - Т. 19, № 1. - С. 42-48; 2017. - Т. 19, № 1. - С. 37-41; 2018. - Т. 20, № 4. - С. 362-369; 2019. - Т. 21, № 2. - С. 171-180; 2019. - Т. 21, № 2. - С. 160-170; 2019. - Т. 21, № 2. - С. 147-159; 2021. - Т. 23, № 3. - С. 280-291; 2021. - Т. 23, № 3. - С. 264-278; **Иммунопатол. Аллергол. Инфектол.** - 2018. - № 2. - С. 59-64; **Antibiotics.** - 2021. - V. 10, N 8. – P. 892; **Front. Microbiol.** - 2021. - V. 12. - P. 620002).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области медицинской микробиологии, в том числе в исследовании молекулярных механизмов формирования антибиотикоустойчивости и наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кузиной Е.С. (**Сиб. Мед. Обозр.** - 2018. - № 3 (111). - С. 73-79; **Рос. Вестн. Перинат. Педиатр.** - 2018. - Т. 63, № 3. - С. 76-83; **Антибиот. Химиотер.** - 2018. - Т. 63, № 11-12. - С. 18-23; 2021. - Т. 66, № 11-12. - С. 9-17; 2022. - Т. 67, № 1-2. - С. 9-15; **J. Glob. Antimicrob. Resist.** - 2019. - V. 18. P. 166-167; **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** - 2020. - V. 96, N 1. - P. 114914; **Int. J. Infect. Dis.** - 2020. - V. 101, - P. 4-5; **Infect. Genet. Evol.** - 2020. - V. 85. - P. 104527; **Инф. Иммуно.** - 2021. - Т. 11, № 2. - С. 324-336; **Antibiotics (Basel).** - 2021. - V. 10, N 6. - P. 691; **Biomedicines.** - 2022. - V. 10, N 6. - P. 1454;), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Кузиной Е.С.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработан комплексный подход выявления и идентификации интегронов классов 1 и 2 у мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий (амплификация генов с помощью специфичных праймеров, секвенирование наборов генных кассет, анализ с помощью базы данных INTEGRALL), позволивший выявить 1247 генных кассет 19 типов в резистомах 2065 клинических изолятов, выделенных в 2003-2019 гг., в том числе, в составе интегронов класса 1 - у 31 % изолятов, а интегронов класса 2 – у 13 % изолятов;

предложен лабораторный образец мультиплексной ПЦР тест-системы для детекции интегронных структур в реальном времени в клинических образцах и в чистых бактериальных культурах, с помощью которого интегроны классов 1 и 2 были идентифицированы в 2019 г. у 63 % изолятов, выделенных от пациентов нейрореанимации, и у 21 % изолятов, выделенных от здоровых сотрудников микробиологической лаборатории;

доказано, что наиболее представленными генными кассетами в составе интегронов классов 1 и 2 в резистомах изолятов клинически значимых грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2019 гг., были *aadB*, *aacA4*, *aacC1*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *blaVIM-2*, *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12*, *orfC*, *orfE*, *orfY* и

sat1, что согласуется с уровнями представленности данных кассет в международной базе данных GenBank;

введены новые представления о возможности сочетания в одном штамме множественных механизмов антибиотикорезистентности, на примере уникального резистома мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39 капсульного типа K23, несущих интегроны класса 1 и гены бета-лактамаз, в том числе карбапенемаз KPC-, NDM- и OXA-типов на плаزمидях групп несовместимости IncC, IncFIB(pQil)/IncFII(K) и IncHI1B, соответственно.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны значимость роли интегროнов классов 1 и 2 как молекулярного механизма формирования фенотипов множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий, возбудителей госпитальных инфекций, а также носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности у госпитализированных пациентов (78 %) и здоровых людей (20 %).

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (культивирование и видовая идентификация бактерий, определение чувствительности к антимикробным препаратам, стринг-тест), молекулярно-генетических (выделение ДНК, полимеразная цепная реакция в классическом режиме и режиме реального времени, секвенирование ДНК), биоинформатических (дизайн олигонуклеотидных праймеров, анализ нуклеотидных последовательностей, аннотация геномов) и статистического анализа (использование программ Excell 2013 и GraphPad Prism версии 8.0.1);

изложены новые знания о представленности интегროнов классов 1 и 2 и их структурах в госпитальных штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных от людей в Российской Федерации в 2003-2019 гг., расширяющие понимание формирования и распространения множественной лекарственной устойчивости в госпитальной и внегоспитальной среде;

раскрыты механизмы формирования фенотипов множественной лекарственной устойчивости в штаммах грамотрицательных бактерий, обусловленные интегронами, идентифицированы 4 новых интегрона класса 1:

In1249 (*dfrA12s-orfF-aadA2*) [GB KT316808]; In1379 (*aadA6Δ3:ISPa21e-gcuD*) [GB KU926353]; In1360 (*gcu87-aadB-aphA15d-aadA1a*) [GB KX218442]; In1375 (*bla_{PBL-1}-aacA4*) [GB KY171972] и 1 новый интегрон класса 2 (*dfrA1Δ3:IS911b-sat1-aadA1*) [GB HM592262];

изучены уникальные резистомы мультирезистентных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2019 г., включающих в себя одновременно интегроны класса 1, эпидемически значимые гены цефалоспориноз СТХ-М-типа и гены карбапенемаз трех классов: А (KPC-2), В (NDM-1) и D (OXA-48);

проведено исследование носительства генов антибиотикорезистентности и грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей инфекций у здоровых людей, сотрудников микробиологической лаборатории, в ходе которого впервые в России описано носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1.

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

разработаны и внедрены: база данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» (Свидетельство №2020621657 от 31.07.2020 г.) – Федеральный уровень внедрения;

методические рекомендации «Лабораторный образец ПЦР тест-системы в реальном времени для детекции генов интегронов классов 1 и 2 у грамотрицательных бактерий», утвержденные Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 27.04.2021 г., протокол № 3, Акт межлабораторных испытаний от 08.06.2022 г. – Учрежденческий уровень внедрения;

определены перспективы использования материалов диссертационной работы в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка от 06.07.2022 г.) – Учрежденческий уровень внедрения;

создана коллекция референс-штаммов грамотрицательных бактерий (n=149), охарактеризованных на наличие генетических детерминант антибиотикорезистентности, депонированных в Государственную коллекцию

патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» (Справки о депонировании 2018-2021 гг.) – Федеральный уровень внедрения;

30 полногеномных последовательностей штаммов грамотрицательных бактерий и 220 нуклеотидных последовательностей генов антибиотикорезистентности размещены в базе данных GenBank – Международный уровень внедрения;

представлены сведения о молекулярно-генетических характеристиках штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в одном из отделений нейрореанимации г. Москвы, используемые для оценки эпидемиологической ситуации, прогнозирования ее развития и выбора оптимальных мер по контролю распространения госпитальных инфекций (Акт внедрения Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11.07.2022 г. – Межведомственный уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты обоснованы большим объемом экспериментальных данных, полученных на сертифицированном и прошедшем поверку оборудовании, воспроизводимость результатов подтверждена проведением серии независимых экспериментов, проведена их статистическая обработка;

идея диссертационного исследования об анализе представленности и структуре интегронов классов 1 и 2 опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, а также обобщении знаний российских и зарубежных специалистов в области изучения механизмов формирования фенотипов антибиотикорезистентности у грамотрицательных бактерий;

установлена корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных и отечественных авторов, касающихся представленности интегронов классов 1 и 2 среди грамотрицательных бактерий;

использованы современные методы получения и обработки информации в рамках систем сбора, обработки и визуализации данных.

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы по теме, проведение экспериментов, анализ и обобщение полученных результатов, апробация результатов исследования, обработка, оформление и публикация результатов.

На заседании 16.12.2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Кузиной Е.С., за решение актуальной научно-практической задачи, связанной с характеристикой и оценкой представленности интегронов классов 1 и 2 в штаммах клинически значимых мультирезистентных грамотрицательных бактерий, важной для современной микробиологии и медицины, ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 9 докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 16, против 0, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 16.12.2022 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.