

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 06.04.2018 г. № 5
о присуждении Лев Анастасии Игоревне, гражданке РФ, ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 01.02.2018 г., протокол № 2 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 Лев Анастасия Игоревна 1991 г. рождения, в 2013 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Челябинский государственный университет» по специальности «Биология». В 2017 г. окончила аспирантуру 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, работает младшим научным сотрудником 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.

Диссертация выполнена в лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии 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, отдел молекулярной микробиологии, лаборатория антимикробных препаратов, заведующая лабораторией антимикробных препаратов.

Официальные оппоненты:

Припутневич Татьяна Валерьевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации, отдел микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии, руководитель отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии;

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, Научно-исследовательский медико-стоматологический институт Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова Минздрава Российской Федерации, отдел фундаментальных исследований, лаборатория молекулярно-биологических исследований, руководитель лаборатории молекулярно-биологических исследований

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 доктором биологических наук, профессором Сергеем Владимировичем Сидоренко, заведующим отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, указала, что диссертация является завершенной научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с молекулярно-генетической характеристикой современных клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных на территории Российской Федерации, а именно определением их генотипов и фенотипов антибиотикорезистентности и вирулентности; представленные на защиту положения диссертации можно квалифицировать как научное достижение в современной микробиологии. По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с внесенными изменениями, утвержденными постановлением Правительства от 21 апреля 2016 г. № 335, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Лев Анастасия Игоревна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет **31** опубликованную работу, в том числе по теме диссертации - **26** работ, из которых опубликованных в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК - **6** статей, и 20 тезисов в материалах конференций. Объем опубликованных статей составляет 2,2 п.л., авторский вклад соискателя составляет 75 %.

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. Microbiol. Antimicrob.** – 2015. – Vol. 14. – No. 1. – P. 46. Impact Factor 2.760. Цит. Scopus=11.

2. Volozhantsev, N.V. Complete genome sequence of novel T7-like virus vB_KpnP_KpV289 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae* / N.V. Volozhantsev, V.P. Myakinina, A.V. Popova, A.A. Kislichkina, E.V. Komisarova, **A.I. Knyazeva***, V.M. Krasilnikova, N.K. Fursova, E.A. Svetoch // **Arch Virol.** - 2016. - Vol. 161. - P. 499-501. Impact Factor 2.058. Цит. Scopus=4.

3. Kislichkina, A.A. Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Russia / A.A. Kislichkina, **A.I. Lev**, E.V. Komisarova, N.K. Fursova, V.P. Myakinina, T.N. Mukhina, A.A. Bogun, N.V. Volozhantsev // **Pathog. Dis.** – 2017. – Vol. 75. – No. 4. – P. ftx024. Impact Factor 2.335

4. **Lev, A.I.** Identification of IS1R and IS10R elements inserted into ompk36 porin gene of two multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* hospital strains / **A.I. Lev**, E.I. Astashkin, R.Z. Shaikhutdinova, M.E. Platonov, N.N. Kartsev, N.V. Volozhantsev, O.N. Ershova, E.A. Svetoch, N.K. Fursova // **FEMS Microbiol. Lett.** – 2017. – Vol. 364. – No. 10. – P. fnx072. Impact Factor 1.765

5. Solovieva, E.V. Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types / E.V. Solovieva, V.P. Myakinina, A.A. Kislichkina, V.M. Krasilnikova, V.V. Verevkin, V.V. Mochalov, **A.I. Lev**, N.K. Fursova, N.V. Volozhantsev // **Virus Res.** – 2017. – Vol. 243. – P. 10-18. Impact Factor: 2.628

6. Volozhantsev, N.V. Genome Sequences of Two NDM-1 Metallo- β -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant Strains of *Klebsiella pneumoniae* with a High Degree of Similarity, One of Which Contains Prophage / N.V. Volozhantsev,

A.A. Kislichkina, **A.I. Lev**, T.N. Mukhina, A.A. Bogun, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, N.K. Fursova // **Genome Announc.** – 2017. – Vol. 5. – No. 42. – P. pii: e01173-17. 2015.

Примечание: * - фамилия Лев А.И. до 31 октября 2015 г.

На диссертацию и автореферат поступили положительные отзывы без замечаний от: **(1)** канд. мед. наук, доцента **Тапальского Дмитрия Викторовича**, заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Гомельского государственного медицинского университета, г. Гомель, Беларусь; **(2)** д-ра биол. наук, доцента **Михайловой Елены Алексеевны**, заведующей кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Оренбургского государственного медицинского университета и доктора биологических наук, профессора **Галины Николаевны Соловых**, ученого секретаря того же учреждения, г. Оренбург; **(3)** д-ра биол. наук, профессора **Пряхина Евгения Александровича**, заведующего экспериментальным отделом Уральского научно-практического центра радиационной медицины, г. Челябинск; **(4)** канд. биол. наук, доцента **Хайдаршиной Наэли Эмильевны**, доцента кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии Челябинского государственного университета, г. Челябинск (в отзыве отмечено наличие в автореферате небольшого количества опечаток и ошибок); **(5)** академика РАН, д-ра биол. наук, профессора **Егорова Алексея Михайловича**, главного научного сотрудника кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва; **(6)** канд. биол. наук **Эйдельштейна Михаила Владимировича**, заведующего лабораторией антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, г. Смоленск.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что:

доктор мед. наук Припутневич Т.В. является признанным специалистом в области клинической микробиологии и имеет научные публикации в сфере

исследований, соответствующей кандидатской диссертации Лев А.И. (**Virchows Archiv.** - 2017. - Т. 471. - № S1. - С. S97; **Бюл. Эксп. Биол. и Мед.** - 2017. - Т. 163. - № 6. - С. 784-787; **Клин. Микробиол. Антимикроб Химиотер.** - 2017. - Т. 19. - № 1. - С. 31-36; **Акушерство и гинекология.** - 2016. - № 12. - С. 114-120; **Генетика.** - 2016. - Т. 52. - № 9. - С. 1097-1102; **Рос. Вестн. Перинатол. и педиат.** - 2014. - Т. 59. - № 1. - С. 51-56.);

доктор мед. наук, профессор Николаева Е.Н. является высококомпетентным специалистом в сфере микробиологии и молекулярных методов детекции генетических детерминант и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Лев А.И. (**Ортодонтия.** - 2013. - № 4 (64). - С. 6-8; **Dental Forum.** - 2013. - № 2. - С. 2-4; **Клин. Лаб. Диагнос.** - 2016. Т. 61. № 1. С. 54-59; **Национальные приоритеты России.** - 2016. - № 4 (22). - С. 136-141; **Клин. Стоматол.** - 2017. - № 1 (81). - С. 26-33; **Dental Forum.** - 2017. - № 1 (64). - С. 24-26).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения вопросов молекулярных механизмов антибиотикорезистентности у грамположительных и грамотрицательных бактерий; раскрытия особенностей горизонтального переноса генов и молекулярной эпидемиологии, а также наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Лев А.И. (**Int. J. Antimicrob. Agents.** - 2014. - Т. 44. - № 2. - С. 152-155; **Антибиотики и химиотер.** - 2015. - Т. 60. - № 9-10. - С. 17-22; **Клин. Лаб. Диагнос.** - 2015. - Т. 60. - № 10. - С. 58-61; **Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.** - 2015. - Т. 17. - № 3. - С. 217-226; **Фарматека.** - 2015. - № 14 (307). - С. 9-16; **Антибиотики и химиотер.** - 2016. - № 11-12. - С. 28-38; **Jpn. J. Antibiot.** - 2016. - Т. 69. - № 1. - С. 41-51; **Antimicrob. Agents Chemother.** - 2017. - Т. 61. - № 2. - С. e01856).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан комплексный подход к анализу фенотипических и молекулярно-генетических особенностей устойчивости к антибактериальным препаратам и вирулентности клинических штаммов *K. pneumoniae*, что позволило выявить высокую гетерогенность штаммов и зафиксировать появление в обследуемом отделении NDM-1-продуцирующих штаммов, описать интеграцию IS-элементов в ген мажорного поринового белка клебсиелл OmpK36 и их влияние на чувствительность к антибактериальным препаратам;

предложен алгоритм описания генотипов антибиотикорезистентности клинических штаммов *K. pneumoniae*, основанный на детекции генов бета-лактамаз, генов пориновых белков и интегронов классов 1 и 2; и генотипов вирулентности штаммов, основанный на выявлении 7 генов вирулентности;

доказано, что *K. pneumoniae* в условиях обследуемого нейрореанимационного отделения г. Москвы являлись источником распространения генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48}-типа среди энтеробактерий других видов – *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. и *Serratia marcescens*;

введены новые термины «R-генотип» и «Vir-генотип» для характеристики принадлежности штамма к генетическим группам на основе наборов генов антибиотикорезистентности и вирулентности.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказан факт приобретения клиническими гипервирулентными штаммами клебсиелл генотипа ST23^{K1} одновременно двух генов эпидемических бета-лактамаз –цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-15} и карбапенемазы *bla*_{OXA-48}; экспериментально подтверждена принципиальная возможность приобретения генов бета-лактамаз и их экспрессии без снижения степени вирулентности клебсиелл для лабораторных животных;

применительно к проблематике диссертации результативно, то есть с получением обладающих новизной результатов, использован комплекс существующих базовых методов микробиологических (культивирование микроорганизмов, их видовая идентификация, определение чувствительности

к антибактериальным препаратам), биологических (оценка вирулентности штаммов *K. pneumoniae* на мышинной модели), молекулярно-генетических (конъюгация, трансформация, полимеразная цепная реакция), биохимических (выделение ДНК, липополисахаридов и пориновых белков бактерий) и биоинформационных (компьютерный анализ последовательностей ДНК и секвенированных геномов, построение филогенетических деревьев);

изложены доказательства вклада генов бета-лактамаз, интегронов и пориновых белков в молекулярно-генетические механизмы формирования устойчивости к антибактериальным препаратам у клинических штаммов *K. pneumoniae*;

раскрыта сравнительная значимость генов вирулентности клебсиелл для проявления вирулентности на модели аутбредных мышей: *aer*, *rmpA*, *allR*, *kfu* и *ige* (в порядке убывания);

изучен молекулярный механизм формирования «дефектного» негипермукоидного фенотипа у *rmpA*-позитивного штамма, основанный на точечной делеции в данном гене;

проведена модернизация внутривидового генотипирования штаммов *K. pneumoniae*, основанная на определении генотипов антибиотикорезистентности и генотипов вирулентности.

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

разработаны и внедрены методические рекомендации «Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) штаммов *Klebsiella pneumoniae*» (Оболensk, 2015 г.) и «Генотипирование штаммов *Klebsiella pneumoniae* на основе детекции генов антибиотикорезистентности и вирулентности» (Оболensk, 2016 г.); раздел учебной программы дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка №73 от 26 октября 2017 г.) - учрежденческий уровень внедрения;

определены возможности практического использования молекулярно-генетической характеристики клинических штаммов *K. pneumoniae* для оценки эпидемиологической ситуации, прогнозирования ее развития и выбора оптимальных мер по контролю клебсиеллезных инфекций в отделении нейрореанимации Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Акт внедрения от 22.11.2017 г.) – региональный уровень внедрения;

создана коллекция современных клинических штаммов *K. pneumoniae*, электронный каталог и база данных «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» (ФИПС №2017621413) – федеральный уровень внедрения;

представлены в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» 45 референс-штаммов; в международную базу данных GenBank - 497 нуклеотидных последовательностей генов и 5 геномов штаммов *K. pneumoniae*, в базу данных MLST института Пастера (Франция) - 45 штаммов 14 сиквенс-типов – международный уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты экспериментальной работы были получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов в разных условиях, задействованы современные методы исследований, работы проводились согласно существующим Российским и международным протоколам;

теория исследования согласуется с опубликованными экспериментальными данными исследователями в других регионах мира;

идея диссертационного исследования базируется на анализе большого объема литературных данных, касающихся вопросов клинической значимости,

антибиотикорезистентности, вирулентности и эволюции бактерий вида *K. pneumoniae*;

использовано сравнение данных, полученных автором в ходе исследования, с представленными в научной литературе;

установлено совпадение полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными других авторов: возрастание роли *K. pneumoniae* как этиологического агента госпитальных инфекций; высокий уровень устойчивости *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам разных функциональных классов; значимость мутаций в гене поринового белка OprK36 для изменения чувствительности к карбапенемам; принадлежность штаммов к эпидемически значимым генетическим линиям *K. pneumoniae*;

использованы современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично работ по идентификации штаммов бактерий; выделению чистых культур из клинических образцов в рамках трех одномоментных исследований; выявлении гипермукоидного фенотипа у клинических штаммов; приготовлении матрицы ДНК (термолизатов) для полимеразной цепной реакции; ПЦР-детекции генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности штаммов *K. pneumoniae*; выделении плазмидной ДНК; конъюгативной передаче плазмид антибиотикорезистентности; определении чувствительности к антибактериальным препаратам; подборе оптимальных условий для эффективной амплификации участков генов капсулообразования клебсиелл и генов «домашнего хозяйства»; разработке алгоритма определения «генотипов резистентности» и «генотипов вирулентности»; изучении экспрессии генов бета-лактамаз; анализе нуклеотидных последовательностей изучаемых генов и геномов штаммов; филогенетическом анализе последовательностей генов. Кроме того, автор принимала участие в генотипировании штаммов методом RAPD, в выделении ЛПС и пориновых белков изучаемых штаммов,

