

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор ФГАУ

«Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»

Министерства здравоохранения
Российской Федерации

доктор медицинских
наук, профессор А.П. Фисенко



« 16 » 07 2020 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России) на основании решения заседания лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Диссертация «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.» выполнена в лаборатории микробиологии Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации Бржозовской Екатериной Анатольевной.

Бржозовская Екатерина Анатольевна, 1991 года рождения, гражданство Российская Федерация, окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национально-исследовательский медицинский университет им. Н.И.

Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России) в 2014 году по специальности «Медицинская кибернетика».

С 2016 года является соискателем лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. По результатам выполненной работы подготовлена диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 «Микробиология» на тему «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.».

Соискатель Бржозовская Екатерина Анатольевна работала с 2015 года лаборантом-исследователем, а в период подготовки диссертации работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России с 2016 г. по настоящее время.

Справка №199/20 о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2020 году в ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Научный руководитель: Маянский Николай Андреевич, доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующий центром лабораторной диагностики Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Тема диссертационного исследования была утверждена на заседании Ученого совета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, протокол №1 от 26 января 2016 г.

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат» и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

По итогам обсуждения диссертационного исследования «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.», представленного на

соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 «Микробиология» принято следующее заключение:

ОЦЕНКА ВЫПОЛНЕННОЙ СОИСКАТЕЛЕМ РАБОТЫ

Диссертация Бржозовской Е.А. «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.» является законченным научным исследованием, выполненным на современном молекулярно-генетическом уровне, а также с применением и классических бактериологических методов. Положения и выводы, сформулированные Бржозовской Е.А., логически вытекают из результатов проведенных исследований.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) являются наиболее частой причиной респираторных бактериальных инфекций таких как острый средний отит, синусит и внебольничная пневмония, при этом являются этиологической причиной и таких жизнеугрожающих инвазивных инфекций, как сепсис и менингит, связанных с высокой заболеваемостью и летальностью, особенно среди педиатрической популяции.

Пневмококки, характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью, наиболее часто демонстрируют резистентность к β -лактамам и макролидам, вследствие широкого и нередко необоснованного использования этих групп антибиотиков для терапии. Частое применение антибиотиков обуславливает возрастание частоты выделения резистентных пневмококков и определяет необходимость постоянного мониторинга чувствительности к антибиотикам и изучение молекулярных механизмов формирования устойчивости. За последние годы возрос уровень распространенности устойчивых к антибиотикам штаммов пневмококка и выявление полирезистентных штаммов пневмококка вызывает большую обеспокоенность.

В последние годы для профилактики инфекций, вызванных *S. pneumoniae* для массовой вакцинации используют пневмококковые полисахаридные конъюгированные вакцины (ПКВ), эффективность которых была продемонстрирована во многих странах и 13-валентная пневмококковая полисахаридная конъюгированная вакцина была добавлена в Российский национальный календарь профилактических прививок в 2014 году. Однако спектр циркулирующих серотипов может варьировать в разных странах вследствие селективного давления ПКВ-вакцинации, поэтому необходимо проводить мониторинг региональных данных о наиболее актуальных циркулирующих серотипах, в том числе обладающих наибольшей резистентностью к антибиотикам для описания эпидемиологической эффективности ПКВ-вакцинации.

Применение молекулярно-генетических методов для изучения и анализа эпидемиологии пневмококковых инфекций и распределения актуальных серотипов имеет важное практическое значение для здравоохранения и остается важным для понимания негативной динамики успешного распространения резистентных штаммов *S. pneumoniae* и формирования множественной лекарственной устойчивости, а также влияния вакцинации на серотиповой состав, циркулирующих пневмококков. Полученные результаты диссертационного исследования Бржозовской Е.А. позволяют корректировать рекомендации по антибактериальной терапии.

Таким образом, вышеизложенная информация говорит о необходимости регулярного мониторинга за структурой серотипов пневмококка и ее антибиотикорезистентностью, основанного на изучении молекулярных механизмов, приводящих к потере чувствительности *S. pneumoniae* к антибактериальным препаратам.

ЛИЧНОЕ УЧАСТИЕ СОИСКАТЕЛЯ В ПОЛУЧЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ, ИЗЛОЖЕННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

Бржозовская Екатерина Анатольевна самостоятельно выполняла бактериологические исследования для изолятов из коллекции *S. pneumoniae*, характеризующихся устойчивостью к трем и более группам антимикробных препаратов, осуществляя культуральный посев, реидентификацию микроорганизма, проводила определение чувствительности изолятов пневмококка к 10 группам антимикробных препаратов методом микроразведения антибиотика в бульоне с определением минимальных подавляющих концентраций, а также осуществляла определение серотипа с применением реакции Нейфельда с использованием специфических антисывороток. Бржозовская Е.А. проводила молекулярно-генетические исследования, а именно выделение ДНК, определение генов устойчивости к макролидам/линкозамидам, тетрациклину и хлорамфениколу с применением ПЦР и последующей детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. Серотипирование пневмококка при помощи мультиплексной ПЦР, детекцию и интерпретацию результатов, а также проведение мульти-локусного секвенирования и анализ полученных данных проводила совместно со старшим научным сотрудником к.м.н. Алябьевой Н.М. в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Селекцию ПКВ13- и невакцинных МЛУ-изолятов пневмококка для проведения полногеномного секвенирования, статистический анализ и биоинформатическую обработку экспериментальных данных и результатов полногеномного секвенирования проводили совместно с заведующим центром лабораторной диагностики Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, д.м.н., профессором РАН Маянским Н.А. и со старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России к.б.н. Савиновой Т.А.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждают данные полученные с использованием сертифицированных микробиологических методов, характеризующихся высокой чувствительностью и специфичностью. Проведено исследование среди большой выборки изолятов, позволяющее корректно проводить статистический анализ экспериментальных данных. Результаты молекулярно-генетического исследования генов, обуславливающих устойчивость к тестируемым в исследовании антибиотикам, позволило получить сопоставимые результаты с традиционными микробиологическими методами оценки чувствительности, что свидетельствует о достоверности полученных результатов. Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследованы и описаны актуальные серотипы циркулирующих изолятов *S. pneumoniae*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью и идентифицированы доминирующие серотипы 19F, 6B, 14, 19A, 23F. Показано, что преобладающими невакцинными серотипами с множественной лекарственной устойчивостью были серотипы 23A, 13, 28F и 11A.

Впервые проведено исследование чувствительности изолятов пневмококков, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью с определением минимальной подавляющей концентрации для десяти групп антибиотиков и описаны преобладающие фенотипы резистентности. Впервые показано, что анализируемая популяция *S. pneumoniae* отличается высокой резистентностью к основным антибактериальным препаратам, в том числе антибиотикам из группы β -

лактамов, в сочетании с устойчивостью к эритромицину, клиндамицину, тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу.

Описаны новые данные о основных молекулярных механизмах устойчивости пневмококков, включая носительство генов *ermB* (макролиды/линкозамиды), *tetM* (тетрациклин), *catpQ194* (хлорамфеникол), мутации генов *folA* и *folP* (триметоприм/сульфаметоксазол), а также *parC/parE* и *gyrA/gyrB* (фторхинолоны).

Впервые проведено сопоставление серотипов и генотипов пневмококков с фенотипом множественной лекарственной устойчивости, позволяющее охарактеризовать новый возникший клон пневмококков ST2754 серотипа 13, распространенный в РФ и обнаружить изолят пневмококка серотипа 15A ST14599 с множественной лекарственной устойчивостью, возникший вследствие переключения локуса полисахаридной капсулы *cps* у пневмококка серотипа 19A, депонированного в международную базу данных GenBank (регистрационный номер WMIJ01000000). В международную базу данных PubMLST аннотировано 12 новых сиквенс-типов и 7 новых аллелей генов домашнего хозяйства пневмококков.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выявленные особенности серотипового распределения изолятов пневмококков, обладающих фенотипом множественной лекарственной устойчивости и знания о распространенности среди них ПКВ13-серотипов позволяют прогнозировать положительное влияние вакцинации в преодолении устойчивости.

При исследовании чувствительности пневмококков с множественной лекарственной устойчивостью к 10 группам антибиотиков стало возможным выявить спектр антимикробных препаратов, используемых для эмпирической антимикробной терапии, а именно цефтриаксон, цефтаролин, фторхинолоны,

ванкомицин, что следует учитывать при выборе терапии инфекций, ассоциированных с резистентными пневмококками.

Полученные данные о разнообразии генотипов популяции *S. pneumoniae* и ее динамике отражают закономерности эволюции генетической структуры и указывают на то, что одним из важных факторов этой эволюции является устойчивость к антибиотикам.

Идентификация невакцинного клона ST2754 с множественной лекарственной устойчивостью и рекомбинантного изолята серотипа 15А нового сиквенс-типа ST14999, появившегося в результате геномной перестройки локуса полисахаридной капсулы *cps* пневмококка серотипа 19А распространенного клона ST276 – демонстрируют свойства пластичности постоянно претерпевающей динамические изменения пневмококковой популяции под воздействием антибактериальной терапии и вакцинации, отражает необходимость дальнейшего мониторинга с использованием молекулярно-генетических методов.

ЦЕННОСТЬ НАУЧНЫХ РАБОТ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Ценность научных работ соискателя заключается в том, что в них исследован серотиповой состав и спектр чувствительности к антибиотикам, а также механизмы резистентности к наиболее часто применяемым в клинической практике антибиотикам. Научная работа соискателя развивает и дополняет имеющиеся в литературе данные по исследуемым вопросам. Полученные результаты определяют перспективы практического использования антибиотиков клинической практике.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКУ

Результаты исследований в качестве диагностических технологий внедрены в практическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и лаборатории клинической бактериологии

Российской детской клинической больницы ФГАУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

ЭТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА НАУЧНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В
ЛОКАЛЬНОМ ЭТИЧЕСКОМ КОМИТЕТЕ (ПО МЕДИЦИНСКИМ И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМ НАУКАМ)

На совместном заседании ученого совета и этического комитета, протокол №1 от 26.01.2016, было единогласно принято положительное этическое заключение о проведении диссертационного исследования Бржозовской Е.А. «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.», с последующей защитой по специальности 03.02.03 «Микробиология».

НАУЧНАЯ СПЕЦИАЛЬНОСТЬ, КОТОРОЙ СООТВЕТСТВУЕТ
ДИССЕРТАЦИЯ

Диссертационная работа Бржозовской Е.А. «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.», выполненная под научным руководством доктора медицинских наук, профессора РАН Маянского Николая Андреевича, является научно-квалификационным трудом, соответствующим шифру специальности 03.02.03 «Микробиология». Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом НИР в рамках комплексной программы в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (№ государственной регистрации АААА-А19-119012590151-7).

ПОЛНОТА ИЗЛОЖЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ В
РАБОТАХ, ОПУБЛИКОВАННЫХ СОИСКАТЕЛЕМ

Результаты проведенного диссертационного исследования в полном объеме представлены в 7 научных публикациях, в журналах из перечня

рецензируемых научных изданий ВАК, 4 из них - реферируемые базой данных Scopus и Web of Science.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ БЫЛИ ДОЛОЖЕНЫ И ОБСУЖДЕНЫ НА НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ:

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на 27-м (Вена, 2017), 29-м (Амстердам, 2019), 30-м (Париж, 2020) Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ECCMID); XXI Международном конгрессе по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID (Москва, 2019); на 14-й Европейской конференции молекулярной биологии пневмококков (Eugor pneumo) (Грайфсвальд, 2019); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Осенние Филатовские чтения - важные вопросы детского здоровья" (Пенза, 2019); на заседаниях Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, 2017; Российская детская клиническая больница ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, 2019).

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 7 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (из них 3 статьи в зарубежных научных изданиях, индексируемых Scopus, Web of Science), 4 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 3 зарубежных конференции).

Статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Университета:

- 1) Mayanskiy, N. Antimicrobial resistance, penicillin-binding protein sequences, and pilus islet carriage in relation to clonal evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Russia, 2002-2013 / N. Mayanskiy, T. Savinova, N.

Alyabieva, O.Ponomarenko, E. Brzhozovskaya, A. Lazareva, L. Katosova, R. Kozlov // *Epidemiology and Infection*. Cambridge Press. - 2017. - Vol. 145. № 8. P. 1708–1719.

2) Mayanskiy, N. Changing serotype distribution and resistance patterns among pediatric nasopharyngeal pneumococci collected in Moscow, 2010–2017 / N. Mayanskiy, T. Kulichenko, N. Alyabieva, E. Brzhozovskaya, O. Ponomarenko, T. Savinova, A. Lazareva // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2019. - Vol. 94. № 4. P. 385–390.

3) Savinova, T. A multiple drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* of serotype 15A occurring from serotype 19A by capsular switching / T. Savinova, E. Brzhozovskaya, D. Shagin, Y. Mikhaylova, A. Shelenkov, Y. Yanushevich, N. Mayanskiy // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38. P. 5114-5118.

4) Маянский, Н.А. Динамика распространенности серотипов и антибиотикорезистентности носоглоточных пневмококков, выделенных у детей в 2010–2016 гг.: результаты ретроспективного когортного исследования / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко, Т.В. Куличенко, И.В. Артемова, А.В. Лазарева, Е.А. Бржозовская, О.В. Шамина, Л.К. Катосова // *Вопросы современной педиатрии*. – 2017. - Т. 16. – № 5. – С. 413-423.

в иных изданиях:

1) Маянский, Н.А. Антибиотикорезистентность и клональная эволюция *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19А в России, 2002-2013 гг. / Н.А. Маянский, Т.А. Савинова, Н.М. Алябьева, О.А. Пономаренко, Е.А. Бржозовская, А.В. Лазарева, Л.К. Катосова, Р.С. Козлов // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. - 2017. - Т. 19. – № 2. – С. 145-151.

2) Мирзаева, А.Р. Назофарингеальное носительство *Streptococcus pneumoniae* у детей младше 5 лет на фоне массовой вакцинации от пневмококка в республике Хакасия / А.Р. Мирзаева, Т.В. Куличенко, О.И. Лебедева, З.А. Алачева, Т.Г. Кузнецова, Н.М. Алябьева, Е.А. Бржозовская, Н.А. Маянский // *Российский педиатрический журнал*. - 2019. - Т. 22. – № 4. –

С. 196-204.

3) Алябьева, Н.М. Серотиповой состав *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от детей в Москве до и после внедрения 13-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины / Н.М. Алябьева, Е.А. Бржозовская, О.А. Пономаренко, А.В. Лазарева // Российский педиатрический журнал. - 2020. - Т. 23. – № 3. – С. 160-164.

Диссертация соответствует требованиям п. 19 Положения о присуждении ученых степеней Университета и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

Диссертационная работа «Фенотипические и молекулярно-генетические характеристики носоглоточных *Streptococcus pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных у детей в 2010-2017 гг.» Бржозовской Е.А. рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Заключение принято на заседании лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Присутствовало на заседании 14 человек

Результаты голосования: «за» – 14 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 1 от 13 марта 2020 г.

Председательствующий на заседании
заслуженный деятель науки Российской Федерации,
главный научный сотрудник
лаборатории нейробиологии и
фундаментальных основ развития мозга
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
д.м.н., профессор

 И. Е. Смирнов

Подпись Смирнова И.Е. удостоверяю:

Ученый секретарь

ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
к.м.н.



 А.Г. Тимофеева