

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.078.02
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО КАЗЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 20 сентября 2018 г. № 10

О присуждении Лемасовой Людмиле Викторовне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Дифференциация возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР в режиме реального времени» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 14 июня 2018 г. (протокол заседания № 8) диссертационным советом Д 208.078.02, созданным на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, приказом Минобрнауки России № 903/нк от 6 августа 2015 года.

Соискатель Лемасова Людмила Викторовна 1987 года рождения. В 2010 году соискатель окончила Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Работает в должности научного сотрудника в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории генодиагностики Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский

противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель - кандидат медицинских наук, доцент, Ткаченко Галина Александровна, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория генодиагностики, заведующая лабораторией.

Официальные оппоненты: Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория биохимии микробов, заведующий лабораторией; Портенко Светлана Анатольевна, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел диагностики инфекционных болезней, заведующая отделом, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, в своем положительном заключении, подписанном Платоновым Александром Евгеньевичем, доктором биологических наук, профессором, лаборатория эпидемиологии природно-очаговых инфекций, заведующий лабораторией, и Симоновой Еленой Геннадиевной, доктором медицинских наук, профессором, лаборатория эпидемиологии природно-очаговых инфекций, ведущий научный сотрудник, указала, что принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы нет. Однако имеются замечания частного характера: 1. К некоторому отклонению от современных стандартов подготовки научных публикаций можно отнести включение в разделы, посвященные собственным результатам, рассмотрение работ иных авторов по сходной тематике, правильнее было бы провести такое рассмотрение в разделе «Обзор литературы» или в специально выделенном разделе для сопоставления собственных данных и результатов других исследований.

2. Недостатком является излишняя и бессмысленная точность представления результатов, до второго знака после запятой. 3. Для оценки абсолютной эффективности ПЦР (и количества ДНК-мишеней в пробе) необходимо введение в постановку реакции калибраторов с известной концентрацией геномных копий мишени. Возможно, что это упущение будет исправлено на стадии государственной регистрации набора реагентов в качестве медицинского изделия. 4. При описании экспериментов на животных отсутствует указание на наличие разрешения этического комитета. Предполагаем, что такое разрешение существует, но указание на него должно присутствовать в тексте любой публикации по результатам экспериментов.

Высказанные замечания не влияют на положительную оценку диссертационного исследования в целом. Диссертация Лемасовой Людмилы Викторовны является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей важное значение для микробиологии: разработана и испытана лабораторная методика для выявления и ускоренной дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Работа Лемасовой Людмилы Викторовны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 27 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 15 работ общим объемом 56 страниц, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 2 работы. Опубликовано 2 патента Российской Федерации. Опубликовано 2 патента Российской Федерации. Опубликовано 2 патента Российской Федерации. Опубликованные работы отражают все разделы диссертации. Соискатель принимала непосредственное участие в подготовке всех работ, в 10 из них является первым автором. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Наиболее значительные работы: 1. Бондарева, О.С. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК / О.С. Бондарева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, В.А. Антонов // Молекулярная генетика,

микробиология и вирусология. – 2016, № 1, Т. 34. – С. 33-37. 2. Лемасова, Л.В. Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения и дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени / Л.В. Лемасова, Г.А. Ткаченко, С.С. Савченко, О.С. Бондарева, В.А. Антонов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016, Вып. 4. – С. 56-59. 3. Патент 2556810 Российская Федерация, МПК C12Q1/68 Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации *Burkholderia pseudomallei* / Л.В. Лемасова, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2014116185/10; заявл. 22.04.2014; опубл. 20.07.2015, Бюл. № 20 – 8с.

На диссертацию и автореферат дали положительные отзывы без замечаний: 1. Василенко Надежда Филипповна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2. Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 3. Адельшин Ренат Викторович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 4. Тихонов Сергей Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент, директор Федерального казенного учреждения здравоохранения «Противочумная станция Республики Крым» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 5. Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, временно исполняющая обязанности заместителя директора по научной работе, заведующая музеем живых культур с

центром патогенных для человека вибрионов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 6. Писарева Мария Михайловна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 7. В положительном отзыве Абаева Игоря Валентиновича, кандидата медицинских наук, ведущего научного сотрудника лаборатории антимикробных препаратов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека содержится следующее замечание: «В разделе «Научная новизна» на странице 5 и в разделе «Результаты исследований» на странице 11 утверждается, что ген *fliP* кодирует «белок биосинтеза флагеллина *B. mallei*», а на странице 11 есть словосочетание «кодирующий экспрессию белка».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается, тем, что Водопьянов Сергей Олегович является ведущим специалистом в области молекулярной биологии возбудителей особо опасных болезней, Портенко Светлана Анатольевна – специалист в области диагностики инфекционных болезней, в частности в вопросах индикации и идентификации патогенов. Ведущая организация занимает одно из лидирующих положений в Российской Федерации по разработке и производству тест-систем для молекулярной диагностики инфекционных болезней.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: предложены уникальные ДНК мишени для проведения дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза на основе фрагмента гена *fliP* и участка генома, кодирующего белок Grb8. Разработан оригинальный методический подход, позволяющий методом мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени выявлять ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза и дифференцировать их между собой. Доказано, что использование разработанного набора реагентов для диагностики сапа и мелиоидоза обеспечивает обнаружение ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* у животных на ранних

стадиях развития инфекционного процесса. Оригинальность разработанного подхода, олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов подтверждена получением двух патентов на изобретение (№2551208 от 20.05.2015 г., № 2556810 от 20.07.2015 г.).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что разработан методический подход на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, позволяющий за короткий срок выявлять и дифференцировать ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* в пробах чистых культур, клинического, биологического материала и объектов окружающей среды. Применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс базовых методов: микробиологических, биологических, молекулярно-генетических и биоинформационных. С их помощью получены обладающие новизной результаты, заключающиеся в: выборе с помощью анализа *in silico* уникальных ДНК мишеней для идентификации и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза; конструировании олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов на выбранные ДНК мишени; разработке набора реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-РВ» в формате мультиплексной ПЦР для обнаружения и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с аналитической чувствительностью 1×10^2 - 1×10^4 микробных клеток/мл, специфичностью 100% и воспроизводимостью 100%; получении доказательств высокой диагностической эффективности этого набора при исследовании чистых культур сапного и мелиоидозного микробов, проб биологического материала и объектов окружающей среды, искусственно контаминированных возбудителями сапа и мелиоидоза.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что сконструирован «Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-РВ». Проведены контрольные лабораторные испытания для оценки показателей аналитической чувствительности и специфичности разработанного набора реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-РВ» в мультиплексном формате (протокол № 1/15 от 30.05.2015 г., утвержден директором Федерального казенного

учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора). Проведены технические испытания для подтверждения функциональных технических характеристик набора реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-РВ» для представления к государственной регистрации в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения в качестве медицинских изделий (акт технических испытаний № ТИ-02/16 от 30.11.2016 г., утвержден директором Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора). Разработаны и согласованы в ходе испытаний техническая и эксплуатационная документация по производству и применению набора – Технические условия ТУ 9398-013-01898084-2016 и инструкция по применению. Разработанный методический подход применяется в работе сотрудников Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (акт внедрения от 21.04.2016 г.), а также сотрудниками лаборатории молекулярной биологии института тропической медицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра. Полученные результаты диссертационной работы используются при проведении теоретических и практических занятий по лабораторной диагностике сапа и мелиоидоза на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации (акт внедрения от 20.02.2017 г.).

Оценка достоверности результатов исследования выявила: исследования выполнены на сертифицированном и прошедшем метрологическую проверку оборудовании, использованы современные и высокоточные методы, данные получены в повторяющихся экспериментах, и обработаны с помощью современных методов статистического анализа, показана воспроизводимость результатов в различных условиях.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в: планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, их апробации, проведении контрольных лабораторных и технических испытаний, определении диагностической эффективности сконструированного набора реагентов, анализе литературных данных по проблеме,

написании статей, оформлении патентов.

На заседании 20 сентября 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Лемасовой Л.В. ученую степень кандидата медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 5 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология (медицинские науки), 3 доктора наук по специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки), участвовавших в заседании, из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



Кутырев Владимир Викторович

Микшис Наталья Ивановна

21 сентября 2018 г.