

**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 N _____
решение диссертационного совета от 21 сентября 2017 г. N 16

**О присуждении Сеничкиной Айслу Мухамятовне, гражданке России,
ученой степени кандидата биологических наук.**

Диссертация «Разработка способов выявления и идентификации штаммов *Francisella tularensis* с помощью молекулярно-генетических методов» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 14 июня 2017 г., протокол N 12 диссертационным советом 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, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46. Создан Приказом Минобрнауки России № 903/нк от 6 августа 2015 г.

Соискатель Сеничкина Айслу Мухамятовна 1981 года рождения.

В 2011 году соискатель окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского».

Работает младшим научным сотрудником лаборатории молекулярной диагностики в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной диагностики отдела диагностики инфекционных болезней Федерального казенного

учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, **Осина Наталия Александровна**, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория молекулярной диагностики, заведующая лабораторией.

Официальные оппоненты:

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, заведующая лабораторией туляремии.

Кормилицына Марина Ильинична, кандидат биологических наук, ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, старший научный сотрудник лаборатории туляремии, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, пос. Оболенск, в своем положительном заключении, подписанном Павловым Виталием Михайловичем, доктором биологических наук, заведующим лабораторией микробиологии туляремии указала, что замечаний по диссертации, которые бы подвергли сомнению важность и достоверность полученных автором результатов, нет. Диссертация Сеничкиной А.М. по своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 10 работ, 3 из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях, входящих в «Перечень...» ВАК РФ и 1 патент на изобретения. Авторский вклад составляет 60%, объем научных изданий 1,9 п.л.

Опубликованные работы отражают все разделы диссертационной работы, включая выбор локусов, перспективных для выявления ДНК возбудителя туляремии и его идентификации, конструирование на этой основе наборов реагентов для выявления ДНК возбудителя туляремии как в пробах биологического материала, так и в объектах окружающей среды методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, а также экспериментальные исследования и апробация созданных генодиагностических препаратов.

1. Осина Н.А. Разработка амплификационных тест-систем для выявления возбудителя туляремии / Н.А. Осина, **А.М. Сеничкина**, Т.В. Бугоркова, С.А. Щербакова // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2015. - № 2. – С. 54-57. (из Перечня ВАК);

2. **Сеничкина А.М.** Апробация новых генодиагностических препаратов при эпизоотологическом мониторинге территорий Российской Федерации на наличие возбудителя туляремии / А.М. Сеничкина, Н.А. Осина, А.А. Зайцев, Н.М. Усольцева, С.М. Усманова // Здоровье населения и среда обитания – 2015. - № 6 (267). - С. 43-46. (из Перечня ВАК);

3 **Сеничкина А.М.** Определение диагностической эффективности ПЦР с использованием наборов реагентов «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РФФ» при исследовании биологического материала от животных с экспериментальной туляремией / А.М. Сеничкина, Н.А. Осина, А.С. Абдрашитова, В.Г. Германчук // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2016. - № 4. – С. 79-84. (из Перечня ВАК);

4. **Сеничкина А.М.** Подбор референтных штаммов для индикации и идентификации *Francisella tularensis* с помощью молекулярно-генетических методов / А.М. Сеничкина, Н.А. Осина, Т.В. Бугоркова, Д.В. Уткин, С.А. Щербакова, В.В. Кутырев // Молекулярная диагностика — 2014: сб. тр. VIII

На автореферат поступили отзывы: 1. **Еременко** Евгений Иванович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории сибирской язвы ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Отзыв положительный, без замечаний. 2. **Воробьев** Алексей Анатольевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» (филиал, г. Киров) Минобороны РФ и **Фоменко** Олег Олегович, кандидат биологических наук, начальник научно-исследовательского отдела того же института. Отзыв положительный, без замечаний. 3. **Захарова** Ирина Борисовна, кандидат биологических наук, доцент, заведующая лабораторией геномики и протеомики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Отзыв положительный, без замечаний. 4. **Лопатин** Антон Александрович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора. Отзыв положительный, без замечаний. 5. **Мазепа** Андрей Владимирович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора и **Куликалова** Елена Станиславовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела эпидемиологии того же института. Отзыв положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются специалистами в области микробиологии, индикации и идентификации туляремийного микроба, в ведущей организации функционирует лаборатория микробиологии туляремии, специалисты которой занимаются исследованиями, в том числе по профилю работы Сеничкиной А.М.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны два набора реагентов (на основе видоспецифичных *iglBC* генов), которые обеспечивают выявление ДНК туляремийного микроба в пробах клинического, биологического материала и объектах окружающей среды, и также, в случае выделения культуры патогена, его идентификацию методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов;

доказана перспективность использования разработанных препаратов в практике благодаря их высокой чувствительности (1×10^3 м.к./мл) и специфичности (100 %), как при исследовании культур микроорганизмов, так и проб нативного биологического материала и из объектов окружающей среды;

предложена схема подвидовой, биоварной и субпопуляционной дифференциации штаммов возбудителя туляремии с помощью комплексного использования секвенационного анализа фрагмента *sdhA* гена и одного из амплификационных методов идентификации возбудителя туляремии: анализом в ПЦР RD1-области (методика рекомендована экспертами ВОЗ для определения подвидовой принадлежности туляремийного микроба), ПЦР с использованием случайного праймера Chi1f (методика разработана референс центром по туляремии Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии) или разработанных автором подходов, основанных на выявлении генетических локусов FTT1122, FTT1670, FTT1067, *ISFtu2*, которые имеют отличия нуклеотидных последовательностей у разных подвидов туляремийного микроба;

получен патент на изобретение «Набор штаммов бактерий вида *Francisella tularensis* для получения комплекта контрольных ДНК препаратов, комплект ДНК препаратов для генодиагностических исследований» (№ 2443772 от 26.07.2012).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

получены новые данные по вариабельности генома штаммов *F. tularensis* разных подвидов, биоваров и генетических групп;

доказана эффективность использования в качестве ДНК-мишеней для молекулярной идентификации штаммов *F. tularensis* на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов генетических локусов возбудителя туляремии: FTT1122, FTT1670, FTT1067, *ISFtu2*;

определено наличие 4 аллелей фрагмента *sdhA* гена размером 521 п.н., кодирующего синтез сукцинатдегидрогеназы, каталитической NADP субъединицы *F. tularensis*, которые характерны для определенных подвидов, биоваров и субпопуляций туляремийного микроба.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс микробиологических, иммуносерологических и молекулярно-генетических методов, позволивших обосновать направление исследований, выразившихся в успешной реализации задачи по разработке методических подходов к выявлению и внутривидовой дифференциации штаммов *F. tularensis*, на основе использования разработанных наборов реагентов для выявления ДНК *F. tularensis* с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, в сочетании с секвенационным анализом фрагмента *sdhA* гена; дать объективную оценку качества разработанных наборов реагентов и схемы внутривидовой дифференциации возбудителя туляремии для целей лабораторной диагностики.

Практическое значение полученных соискателем результатов исследования подтверждается тем, что:

Сконструированы и зарегистрированы в установленном порядке наборы реагентов для индикации возбудителя туляремии методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов:

- «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов

(Ген *Francisella tularensis* – РЭФ)» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/12108);

- «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Francisella tularensis* — РГФ)» (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/12107).

Разработан и утвержден приказом Росздравнадзора от 11.04.2013 г. № 1346-Пр/13 комплект регистрационной документации: «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ» - ТУ 9398-036-01898109-2011, инструкция по применению, «Ген *Francisella tularensis* — РГФ» - ТУ 9398-035-01898109-2011, инструкция по применению.

Разработан и утвержден директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора пусковой регламент ПУР № 01898109-43-13 на производство «Наборы реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, идентификации штаммов *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени».

Получены акты медицинских испытаний разработанных наборов реагентов, проведенных на базе ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (г. Ставрополь) и ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (Московская обл., п. Оболенск) (акты апробации от 31.05.2011 г. и 06.06.2011 г. соответственно).

По результатам молекулярной идентификации штаммов туляремийного микроба из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора подобраны штаммы *F. tularensis* подвидов *mediasiatica*, *tularensis* субпопуляций AI, AII, *holarctica* биоваров *Ery^S*, *Ery^R*, *japonica*, которые могут быть использованы в качестве референтных при идентификации подвидов и молекулярном типировании штаммов туляремийного микроба с помощью ПЦР и секвенирования.

Штаммы, обозначенные как КМ 3, КМ 4, КМ 5, КМ 6, КМ 7, КМ 8, депонированы в «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Материалы диссертации представлены в практическом руководстве «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (Москва, ЗАО «Шико», 2013 г.), а также используются при чтении лекций и проведении практических занятий на курсах повышения квалификации «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов» при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: результаты экспериментальных исследований получены на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования в сериях опытов;

идея использования праймеров и зондов на основе видоспецифичных *iglBC* генов для конструирования наборов реагентов для выявления ДНК *F. tularensis* базируется, в том числе, на анализе литературных данных о низком уровне сходства нуклеотидных последовательностей этих генов у туляремиального микроба и других видов бактерий;

комплексное использование разработанных вариантов мультилокусной ПЦР и анализа нуклеотидной последовательности фрагмента *sdhA* гена с целью внутривидовой дифференциации *F. tularensis* построено на анализе и обобщении современного опыта по дифференциации возбудителя туляремии и на известных проверяемых фактах (использованы сведения, опубликованные отечественными и зарубежными авторами, а также сведения, содержащиеся в утвержденных методических рекомендациях и указаниях) и согласуются с опубликованными данными по теме диссертации;

установлено, что предлагаемая автором схема идентификации с помощью разработанных вариантов мультилокусных ПЦР имеет преимущество перед предложенными различными авторами подходами по

чувствительности, специфичности, трудоемкости и продолжительности анализа;

использованы современные методы сбора и обработки исходной информации, а также микробиологических, иммуносерологических и молекулярно-генетических исследований;

для объективной оценки разработанной тест-системы использовали 155 штаммов микроорганизмов, 116 – *Francisella tularensis* (подвидов *holarctica* (биоваров *japonica* - 5, *Ery^r* и *Ery^s* - 98) - 105, *tularensis* - 9, *mediasiatica* - 2 и *novicida* - 2) и 38 штаммов гетерологичных микроорганизмов.

Все приведенные данные получены в повторяющихся экспериментах. Выборки анализируемых данных представлены в объеме, достаточном для достоверной статистической обработки.

Личный вклад соискателя состоит в: непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах; в апробации результатов исследования, подборе ДНК-мишеней, олигонуклеотидных праймеров, конструирование генодиагностических препаратов «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ» и «Ген *Francisella tularensis* — РГФ», разработке схемы внутривидовой дифференциации *F. tularensis* на основе комплексного использования вариантов мультилокусной ПЦР и анализа нуклеотидной последовательности фрагмента *sdhA* гена. Обработка и интерпретация экспериментальных данных выполнена лично автором. Подготовка основных публикаций по выполненной работе осуществлена как лично автором, так и при ее непосредственном участии.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи (проблемы) по разработке методических подходов для обнаружения и внутривидовой дифференциации штаммов *F. tularensis*, включая конструирование генодиагностических препаратов, использование секвенационных технологий, а также проведение технических и медицинских испытаний, соответствует критерию внутреннего единства, что

подтверждается логической связью этапов исследования и последовательностью их проведения.

Цель диссертации, поставленные задачи, использование методических подходов для их достижения, положения, выносимые на защиту и выводы связаны основной идейной линией и не противоречат друг другу.

Диссертация Сеничкиной А.М. является научно-квалификационным исследованием, по основному содержанию соответствует пунктам 9, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ 24.09.2013 г. № 842 с дополнениями, содержащимися в Постановлении Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335.

На заседании 21 сентября 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Сеничкиной А.М. ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки) и 5 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология (медицинские науки), участвовавших в заседании, из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 21, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета



Попов Юрий Алексеевич

Ученый секретарь
диссертационного совета

Слудский Александр Аркадьевич

22 сентября 2017 г.