

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Кафтыревой Лидии Алексеевны на диссертационную работу Борисовой Анастасии Борисовны на тему: «Молекулярно-генетическая диагностика и клинические особенности заболеваний, вызываемых представителями рода *Bordetella*», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни

Актуальность темы исследования

Коклюш – острое высококонтагиозное инфекционное заболевание. Исход заболевания для каждого определяется наличием или отсутствием у заболевшего приобретенного противокклюшного иммунитета. Единственной мерой активной профилактики коклюша на сегодняшний день является иммунизация. В нашей стране плановая иммунизация против коклюша стала проводиться с 1957 г. цельноклеточной моновакциной, с 1959 г. – цельноклеточной трехкомпонентной вакциной, с 1964 г. – адсорбированной вакциной АКДС. Это позволило снизить заболеваемость коклюшем и смертность от этой инфекции в сотни раз. В Национальном календаре профилактических прививок России предусмотрено четырехкратное введение коклюшной вакцины.

Однако с 1990-х годов в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками регистрируется подъем заболеваемости коклюшем, который объясняется большим количеством отказов родителей от вакцинации детей, необоснованными медицинскими отводами, накоплением «неиммунных» лиц в старших возрастных группах детского населения, утратой специфического иммунитета у взрослых, генотипической изменчивостью возбудителя. Вместе с тем в последние годы в зарубежной литературе стали появляться статьи, свидетельствующие об увеличении циркуляции среди населения *B.holmesii*, как возбудителя коклюшеподобного заболевания. За последние пять лет случаи этого заболевания зарегистрированы во многих странах: Австралии, Северной и Южной

Америке, Азии, Иране, ряде европейских стран. Данные о распространенности *B.holmesii* на территории России до настоящего времени отсутствуют. Зарубежные исследователи предполагают, что современный подъем заболеваемости, регистрируемой как коклюш, в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками может быть обусловлен и циркуляцией *B.holmesii*, в связи с тем, что вакцинация против коклюша не защищает организм от инфекции, вызванной этим видом микроорганизма.

Основным методом лабораторного подтверждения диагноза является культуральный (бактериологический) - выделение и идентификация возбудителя. В идеальных условиях выделение возбудителя у больных с подозрением на коклюш и паракоклюш составляет 80 %. В реальных условиях - не превышает 10%. Это связано со сниженной выживаемостью возбудителей во внешней среде, поздним обследованием больных, применением антибиотиков до начала лабораторного обследования, медленным ростом, контаминацией исследуемого материала другими микроорганизмами, неправильным взятием исследуемого материала. Поэтому приоритетным направлением в диагностике инфекций, вызванных бордетеллами, являются методы амплификации нуклеиновых кислот, в том числе в реальном времени.

В Российской Федерации, несмотря на достижение и поддержание с 2003 г. высокого уровня охвата (более 95%) прививками против коклюша, в 2018 - 2019 гг. отмечается подъем заболеваемости коклюшем с наиболее высокими показателями среди детей раннего возраста (до 1 года). В структуре заболеваемости увеличивается доля стертых и легких форм болезни среди детей старшей возрастной группы и взрослых, а также участились случаи выявления бактерионосителей среди практически здоровых людей. В нашей стране накоплен значительный многолетний опыт в изучении клинического течения коклюшной инфекции у детей и взрослых, очагах инфекции при различных формах тяжести, в зависимости от

биологических свойств возбудителя. Вместе с тем, до настоящего времени в РФ, в связи с отсутствием генодиагностики других видов бордетелл, не было работ, посвященных заболеванию, возбудителем которого явилась *B.holmesii*, и в сравнении с клиникой коклюша, вызванного *B.pertussis*. На сегодняшний момент в нашей стране зарегистрирован лишь один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза методом ПЦР – это «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL», тест-систем, позволяющих проводить детекцию ДНК *B.holmesii*, нет.

В связи с этим, с учетом появления сведений о циркуляции *B.holmesii*, как возбудителя коклюшеподобных заболеваний в различных странах, диссертационная работа Борисовой Анастасии Борисовны, посвященная оптимизации генодиагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний и изучению клинических особенностей течения коклюшеподобного заболевания, вызванного *B.holmesii*, является актуальной.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационной работы Борисовой Анастасии Борисовны определяется тем, что диссертантом впервые разработана методика генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в том числе с выделением *B.holmesii*, и представлена характеристика особенностей клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*.

Впервые разработанная диссертантом методика мультиплексной ПЦР-РВ с идентификацией фрагментов трех инсерционных элементов (IS481, hIS1001, IS1001) и фрагмента гена *ptxA* позволяет выявлять и дифференцировать ДНК трех видов бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii* в биологическом материале, являющихся на сегодняшний день актуальными возбудителями коклюша и коклюшеподобных заболеваний. С использованием типовых коллекционных и диких штаммов микроорганизмов

определены аналитические характеристики разработанной методики - чувствительность составила 5×10^1 ГЭ / мл, специфичность – 100 %, сходимость и воспроизводимость – 100%, а также диагностические характеристики с определением эпидемиологической конкордантности полученных результатов. Автором, основываясь на регламентирующие документы, грамотно проведена оценка валидности разработанного диагностического теста: диагностическая чувствительность составила 98,8 %, специфичность - 99,2 % и индекс точности - 99,0 %. На разработанную методику получен патент на изобретение РФ № 2702240 от 12.10.2018 г.

Диссертантом впервые на примере контингента, госпитализированных в стационар больных с подозрением на коклюш с помощью разработанной методики ПЦР-РВ, зарегистрирована циркуляция *B.holmesii*, как возбудителя заболевания. Моноинфекция была выявлена в 2,3 % случаев, ко-инфекция, вызванная *B.pertussis* + *B.holmesii*, - в 0,8 % случаев и ко-инфекция, вызванная *B.parapertussis* + *B.holmesii*, - в 0,1 % случаев. Для верификации выявления ДНК *B.holmesii*, идентифицированной с помощью разработанной методики, автором были использованы три разные амплификационные методики – изотермическая амплификация (LAMP), экспериментальная серия «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bordetella holmesii* в режиме реального времени» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и прямого секвенирования фрагментов ДНК, что подтвердило достоверность полученных результатов.

Несомненной заслугой автора является впервые подробно представленная клиническая картина заболевания, вызванного *B.holmesii*, которое имеет коклюшеподобный характер и протекает в большинстве случаев ($90,0 \pm 6,7$ %) в виде типичной легкой формы, среднетяжелое течение было выявлено только в случаях сочетанного течения с коклюшем. Среднетяжелые формы заболевания были зарегистрированы в случаях ко-инфекции *B.holmesii* + *B.pertussis*, у пациентов проявлялось в виде

дыхательной недостаточности, учащения приступов кашля, а у детей раннего возраста - нарушениями нутритивного статуса.

Особого внимания заслуживают исследования по разработке дифференциально-диагностических критериев заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с классическим коклюшем, вызванным *B.pertussis*, что, несомненно, будет способствовать повышению качества оказания медицинской помощи при обследовании больных с подозрением на коклюш. На данный раздел работы в соавторстве подана заявка на изобретение.

В целом, используемые материалы, примененные методы исследований, объем проведенных экспериментов обеспечивают выполнение поставленных перед диссертантом задач и научное обоснование выводов и рекомендаций.

Основные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные автором, являются научно-обоснованными и соответствуют результатам проведенных исследований.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов обусловлена современными теоретическими положениями, основанными на глубоком анализе литературы; определяется логически выстроенным планом исследования - проведение аналитических исследований по эффективности внедрения ПЦР-диагностики на территории нашей страны; это послужило обоснованием необходимости совершенствования генодиагностики коклюша с учетом выявления ДНК *B.holmesii*. А также разработка методики мультиплексной ПЦР-РВ с оценкой ее аналитических и диагностических характеристик, апробация разработанной методики для оценки циркуляции *B.holmesii* на примере госпитализированных с подозрением на коклюш пациентов и дальнейшего подробного описания клинической картины коклюшеподобного заболевания с разработкой дифференциально-диагностических критериев, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*. Работа основана на большом

объеме материала и современных методах сбора и обработки информации с использованием высокоспецифичных и высокочувствительных микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформатических, клинических и статистических методов, позволившими автору сформулировать выводы на основе принципов доказательной медицины.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость представленной диссертационной работы заключается в том, что проведенные автором исследования и полученные результаты расширяют представления о глобальной циркуляции *B.holmesii* в мире, как возбудителя коклюшеподобного заболевания, и требуют дальнейших многоплановых исследований с целью оценки эпидемиологической и клинической значимости этого возбудителя в развитии эпидемического и инфекционного процессов коклюшной инфекции на территории России.

Научно обоснована необходимость использования генодиагностики при обследовании больных с подозрением на коклюш, что позволит расширить возможности идентификации разных представителей рода *Bordetella*, являющихся актуальными на сегодняшний день возбудителями.

Практическая значимость научных положений и полученных результатов состоит в том, что применение разработанной методики расширяет возможности лабораторного подтверждения диагноза у больных с подозрением на коклюш. В том числе при легких и атипичных формах клинического течения, контактных лиц в очагах инфекции, а также у длительно кашляющих для установления причин длительного кашля у разных возрастных групп населения, что, в целом, будет способствовать повышению качества оказания медицинской помощи населению.

Разработанная методика генодиагностики может быть эффективно использована при мониторинге возбудителей коклюша и коклюшеподобных

заболеваний в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ.

Результаты диссертационной работы внедрены и реализованы: в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора при подготовке методических указаний «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами»; аналитической справки «Состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в 2013 - 2017 гг.» и доклада на Проблемной комиссии Ученого Совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики» (26.12.2019 г.); использованы в лекционном курсе при проведении региональных семинаров по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и в учебно-образовательном процессе кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинский университет» МЗ РФ.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Материалы диссертационной работы доложены на 5 научно-практических всероссийских конференциях с международным участием. Материалы диссертационной работы достаточно полно отражены в 7 печатных работах, в том числе 5 публикаций в изданиях, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных изданиях, 2 публикации – в сборниках материалов конференций. Получен 1 патент на изобретения РФ, подана заявка на патент.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация построена по традиционному плану и изложена на 166 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 таблицами, 32 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав

собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 219 источников, из которых 43 – отечественных, 176 – зарубежных авторов. Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объеме представлены в автореферате и полностью соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата полностью отвечает существующим требованиям.

Во **введении** раскрыта актуальность избранной темы и показана степень ее разработанности, приведены цель и задачи работы, научная новизна, научно-практическая значимость, подробно изложены методология и методы исследований, представлены личное участие автора в их получении, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов. Методология исследования спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Диссертант лично принимала участие в обследовании 290 пациентов с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания, поступивших в инфекционную клиническую больницу № 1 Департамента здравоохранения города Москвы на лечение. Диссертантом лично исследованы клинические образцы, полученные от 895 больных.

Первая глава **«Обзор литературы»** состоит из трех разделов, содержание которых раскрывает актуальность избранной темы диссертационной работы. Автор интересно описывает историю открытия бордетелл с описанием их биологических свойств и филогенетических взаимоотношений внутри рода. Отдельный раздел посвящен данным о распространенности случаев коклюшеподобного заболевания, вызванного *B.holmesii*, которые регистрируются практически на всех континентах. Борисова А.Б. подробно описывает клиническую картину, пути передачи и особенности каждого зарегистрированного клинического случая. В другой

подглаве Анастасия Борисовна анализирует методы генодиагностики, которые существуют и используют в лабораториях для идентификации возбудителей коклюша и коклюшеподобных заболеваний, их достоинства и недостатки. Автором проанализированы особенности ПЦР-методик, приводится характеристика каждого метода, выделены специфические фрагменты, которые позволяют проводить детекцию ДНК разных бордетелл. Обзор литературы написан хорошим литературным языком и полностью отражает суть проблемы.

Раздел «**Результаты собственных исследований**» состоит из трех больших самостоятельных глав, включающих весь объем проведенных научных исследований.

Во второй главе результатов собственных исследований приведен анализ внедрения ПЦР-диагностики на территории Российской Федерации. Автором проанализировано количество проведенных исследований с 2013 по 2017 гг. отдельно по каждому федеральному округу и продемонстрирована положительная динамика внедрения метода ПЦР-диагностики при обследовании пациентов с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания. Полученные автором данные показывают, что при обследовании пациентов с диагностической целью, наравне с увеличением выявления ДНК *B.pertussis*, наблюдается рост числа образцов с выявлением ДНК бордетелл неустановленного вида, что обосновывает необходимость совершенствования генодиагностики коклюша.

Третья глава работы посвящена разработке методики ПЦР-РВ в мультиплексном формате, которая позволит идентифицировать ДНК *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*. Автором подробно описаны все этапы разработки новой тест-системы и приведены алгоритмы интерпретации результатов. Проведена оценка аналитической чувствительности, специфичности, сходимости и воспроизводимости, валидности разработанной методики ПЦР-РВ. Отдельно автором проанализирована

достоверность выявления ДНК *B.holmesii*, которая была идентифицирована с помощью разработанной тест-системы. Борисовой Анастасией Борисовной на примере контингента больных, госпитализированных в стационар с подозрением на коклюш, с помощью разработанной методики установлена циркуляция *B.holmesii* среди населения в Российской Федерации.

В четвертой главе собственных исследований представлена клиническая картина выявленных случаев заболевания, вызванного *B.holmesii*. Подробно проведен разбор особенностей течения продромального и спазматического периодов при легкой и среднетяжелой формах клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*; проведен сравнительный анализ с особенностями течения этих периодов при коклюше, вызванном *B.pertussis*. Представлены дифференциально-диагностические критерии коклюшеподобного заболевания, вызванного *B.holmesii*, в сравнении с классическим коклюшем, вызванным *B.pertussis*.

В «**Заключении**» автор тщательно анализирует и обсуждает полученные данные, сопоставляя их с данными литературы, и еще раз подчеркивает, что разработанная методика генодиагностики расширяет аналитические и диагностические возможности лабораторной диагностики у больных с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания. Заключение написано обстоятельно, критично и читается с интересом.

Выводы научно обоснованы, подтверждены достоверными результатами, полученными в процессе проведения научной работы, и являются логическим завершением научного исследования, что свидетельствует о том, что автор полностью справился с поставленными целью и задачами.

Соответствие специальности

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальностям 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Вопросы:

1. Позволяет ли разработанная тест-система генодиагностики определять ДНК бордетелл у пациентов, поступивших в стационар на поздних сроках заболевания?
2. Имеются ли особые (дополнительные) клинические или эпидемиологические показания для использования разработанной тест-системы по сравнению с традиционным культуральным исследованием или другими тест-системами?

Заключение

Диссертационная работа Борисовой Анастасии Борисовны на тему: «Молекулярно-генетическая диагностика и клинические особенности заболеваний, вызываемых представителями рода *Bordetella*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни, выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора, Заслуженного деятеля науки РФ Афанасьева Станислава Степановича и кандидата медицинских наук Петровой Марины Семеновны, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи – совершенствование генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в том числе с выявлением ДНК *B.holmesii*, и характеристике особенностей клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Борисовой Анастасии Борисовны отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, № 650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года, № 1168 от 01 октября 2018 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Борисова Анастасия Борисовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией кишечных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: (812) 232-48-83, email: kafLidia@mail.ru)

доктор медицинских наук



Кафтырева Лидия Алексеевна

25 мая 2021 г.

Подпись Л.А. Кафтыревой заверяю:

Ученый секретарь ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: 8 (812) 233-20-92, email: pasteur@pasteurorg.ru)

кандидат медицинских наук



Трифоновна Галина Федоровна

