

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора РАН Маянского Николая Андреевича на диссертационную работу Пименовой Алены Сергеевны на тему: «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Актуальность темы исследования

Несмотря на длительный опыт реализации массовых программ иммунопрофилактики, проблема коклюшной и дифтерийной инфекций по-прежнему остается актуальной для многих стран мира. Так, начиная с 1990-х, даже в странах с удовлетворительным охватом вакцинацией наблюдается всплеск заболеваемости коклюшем. К особенностям современной эпидемиологии коклюшной инфекции относятся высокая заболеваемость у детей в возрасте до 1 года, а также увеличение доли стертых и легких форм коклюша, в том числе среди взрослых, что способствует поддержанию циркуляции возбудителя. В отношении дифтерии также формируется тревожная ситуация. Она связана с увеличением прослойки неиммунных лиц в результате пробелов в программах вакцинации, а также отказа от прививок. Более того, наблюдается явное снижение настороженности врачей в отношении дифтерии и коклюша в странах с низкими уровнями заболеваемости, что влияет на дальнейшее распространение возбудителей среди населения.

В основе лабораторной диагностики дифтерии в настоящее время лежит бактериологический метод, главными недостатками которого являются большая длительность (от трех до пяти дней) и трудоемкость. Молекулярно-генетические методы, которые позволяют выявлять специфические фрагменты генома *C. diphtheriae*, не имеют широкого практического применения, а используются преимущественно в научных целях. Лабораторная диагностика коклюшной инфекции может проводиться с использованием трех методов: бактериологического, серологического, молекулярно-генетического. Быструю и эффективную диагностику независимо от вакцинального статуса, длительности и клинической формы заболевания обеспечивают именно молекулярно-генетические методы, которые, однако, требуют совершенствования.

Таким образом, диссертационная работа А.С. Пименовой, посвященная

совершенствованию молекулярно-генетических методов диагностики дифтерии и коклюшной инфекции, является своевременной и актуальной.

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

Результаты диссертационной работы отличаются высокой новизной. Автор усовершенствовала способ выявления генетического материала возбудителя коклюша с применением технологии изотермической амплификации (LAMP), который позволяет быстро (в течение 4-5 часов) обнаруживать ДНК *B. pertussis* в биологическом материале с необходимой чувствительностью 10^2 копий/мл и специфичностью (100%). Приоритет автора в разработке данного метода закреплен патентом на изобретение РФ.

Для обнаружения ДНК возбудителя дифтерии автором впервые использована методика на основе LAMP, позволяющая быстро обнаруживать ДНК возбудителя, и установлены высокие аналитические характеристики метода (чувствительность $2,3 \times 10^3$ копий/мл, специфичность – 100%).

Для дифференцировки *C. diphtheriae* и других клинически значимых представителей рода *Corynebacterium* автор предложил новую комбинацию ДНК-мишеней (нуклеотидные последовательности генов дифтерийного токсина, репрессора дифтерийного токсина, амилазы и РНК-полимеразы).

С целью надежного разграничения токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* различных биоваров, а также нетоксигенных токснесущих штаммов *C. diphtheriae* автором предложена оригинальная методика на основе ПЦР в мультиплексном формате. Метод позволяет идентифицировать различные виды рода *Corynebacterium* и проводить дифференцировку токсигенности.

Автор тщательно изучила возможности практического применения предложенных молекулярно-генетических методов диагностики коклюша и провела их валидацию при обследовании контактных лиц в очагах коклюша и в организованных коллективах с длительно кашляющими лицами. Впервые была показана пригодность данного метода для выявления не только для больных на разных стадиях течения инфекционного процесса, но и бактерионосителей.

Теоретическая и практическая значимость работы

В диссертационной работе А.С. Пименовой предложены оригинальные

методологические подходы к обследованию пациентов с целью выявления возбудителей дифтерийной и коклюшной инфекции. Результаты апробации этих методов, проведенной автором, обосновывают целесообразность использования ускоренных амплификационных технологий в диагностике этих инфекций.

Теоретическая значимость диссертационного исследования определяется тем, что доказана необходимость применения молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша при обследовании контактных лиц в очагах с целью своевременного выявления больных и бактерионосителей, которым на современном этапе эпидемического процесса отводится ведущая роль в распространении этих инфекций.

Практическая ценность работы заключается в том, что использование предложенных способов генодиагностики возбудителей дифтерии и коклюша, основанных на технологиях амплификации нуклеиновых кислот, улучшит качество лабораторной диагностики данных болезней при обследовании как пациентов на разных стадиях течения инфекционного процесса, так и контактных лиц в очагах, а также будет способствовать своевременному выявлению бактерионосителей.

Автором создана рабочая коллекция образцов ДНК микроорганизмов рода *Corynebacterium* и рода *Bordetella* с целью дальнейшего изучения их внутривидового и межвидового генетического полиморфизма. В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировано 60 штаммов микроорганизмов, относящихся к родам *Corynebacterium* и *Bordetella*, в качестве контрольных типовых штаммов для научных исследований при изучении биологических свойств возбудителей дифтерии и коклюша.

Результаты, полученные автором, внедрены в работу Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Материалы диссертационной работы используются на региональных семинарах для специалистов лабораторной сети по диагностике дифтерии и коклюша в субъектах Российской Федерации.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов, обоснованность выводов по результатам диссертационного

исследования не вызывает сомнений, так как они базируются на большом, репрезентативном и тщательно проанализированном материале.

Достоверность полученных результатов диссертации подтверждается использованием современных методов исследования и значительным объемом выборки, включившей более 1200 штаммов бактерий, выделенных от пациентов, бактерионосителей, контактных лиц из эпидемических очагов коклюшной инфекции и организованных коллективов с длительно кашляющими детьми. Полученные данные подвергнуты корректной статистической обработке, хорошо иллюстрированы таблицами и графическими изображениями.

Основные положения и выводы диссертации отражены в одиннадцати печатных работах, в том числе в трех статьях в рецензируемых научных изданиях, их приоритет закреплен двумя патентами на изобретение РФ.

Основные результаты диссертационной работы доложены на российских и международных научно-практических конференциях.

Диссертация апробирована на объединенном заседании секций Ученого Совета Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Медицинская биотехнология» и «Эпидемиология, микробиология, клиника инфекционных заболеваний», протокол № 4 от 13 июня 2017 года.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа А.С. Пименовой имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 145 российских и 108 иностранных источника. Текст диссертации изложен на 176 страницах машинописного текста и содержит 27 таблиц и 26 рисунков.

Обзор литературы достаточно подробно и полно освещает современные представления о возбудителях дифтерийной и коклюшной инфекций, характеризует эпидемический процесс на территории России и рассказывает о современных подходах к лабораторной диагностике этих инфекционных заболеваний. Глубина и качество освещения материала свидетельствует о хорошем владении автором современными знаниями о

проблеме.

Во второй главе изложен материал по совершенствованию способа генодиагностики возбудителя коклюша на основе метода изотермической амплификации, применение которого позволяет выявлять фрагменты генома *B.pertussis* в образцах биологического материала в течение 4-5 часов от начала исследования с эффективностью 99,4%. Было установлено, что диагностический тест по выявлению ДНК *B. pertussis* в биологическом материале методом LAMP обладает диагностической чувствительностью 99,6% и диагностической специфичностью 98,7%, а диагностическая эффективность составила 99,4%. Научно-практический интерес представляют разделы главы, посвященные описанию результатов применения разработанного теста для обследования контактных лиц в эпидемических очагах, в том числе и в семейных, и в организованных коллективах с длительно кашляющими детьми.

Третья глава посвящена разработке способа генодиагностики возбудителя дифтерии на основе метода изотермической амплификации. Автором представлены последовательности олигонуклеотидных праймеров, состав ПЦР-смесей, режим проведения амплификации. Подробно описана и сама методика выполнения исследования. В ходе работы определены аналитические характеристики предложенного способа: чувствительность составила $4,5 \times 10^2$ копий/мл, специфичность – 100%. Представлены результаты апробации разработанного метода не только на типовых коллекционных и свежeweделенных штаммах *C. diphtheriae*, но и на иммитантах клинических образцов в модельных экспериментах в лабораторных условиях и на клиническом материале, полученном от больных с хроническим тонзиллитом и патологией полости носа.

В главе 4 изложены результаты разработки способа молекулярной диагностики возбудителя дифтерии на основе метода мультиплексной ПЦР. Автором предложена новая комбинация ДНК-мишеней, благодаря которой выявляются генетические детерминанты, определяющие токсигенность и биотип возбудителя дифтерии и позволяющие дифференцировать *C. diphtheriae* от других клинически значимых представителей рода *Corynebacterium*, в частности *C. ulcerans*. Представлены последовательности олигонуклеотидных праймеров, состав ПЦР-смесей и режим проведения амплификации.

Раздел «Заключение» представляет собой краткое описание и анализ наиболее значимых результатов исследования в контексте отечественных и мировых научных данных

по проблеме лабораторной диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций.

Таким образом, полученные автором результаты легли в основу разработки новых способов выявления ДНК возбудителей дифтерии и коклюша в биологическом материале методом изотермической амплификации (LAMP) и методом мультиплекс-ПЦР. Выводы и практические рекомендации логично вытекают из полученных в диссертационной работе результатов, что, с учетом большого объема проведенных экспериментов и использования современных методов лабораторной диагностики, позволяет считать их вполне обоснованными.

Работа представляет собой целостное законченное научное исследование. Тема диссертации, основные положения и выводы соответствуют специальности 03.02.03 – микробиология. Принципиальных замечаний к диссертации нет. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и удовлетворяет требованиям ГОСТ 7.0.11. - 2011.

Вопросы к автору:

1. Насколько велика проблема устойчивости к антибиотикам возбудителей дифтерии и коклюша?
2. Есть ли данные о размере «неиммунной» к дифтерии прослойки (доля лиц с отсутствием/низким титром антител, актуальный охват вакцинацией и т.п.)?
3. Почему Вы используете термин «геном-эквиваленты», а не «число копий» при характеристике чувствительности молекулярных методов?
4. Какой «золотой стандарт» диагноза «коклюш» Вы использовали при оценке диагностических характеристик (Таблица 10) разработанного теста.

Заключение

Диссертационная работа Пименовой Алены Сергеевны «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, доцента Борисовой Ольги Юрьевны, содержащей решение актуальной научно-практической задачи по совершенствованию молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша, основанных на технологиях амплификации нуклеиновых кислот.

По своей актуальности, новизне, методическому уровню и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлением 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 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Пименова Алена Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующий лабораторным отделом
Научно-исследовательского института педиатрии
Федерального государственного автономного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский
центр здоровья детей» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
профессор РАН



Николай Андреевич Маянский

19.03.2018

119991, Российская Федерация, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр.1.
Телефон: +7 (499) 134-30-83, адрес электронной почты: info@nczd.ru.

Подпись Маянского Николая Андреевича заверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного автономного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский
центр здоровья детей» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
кандидат медицинских наук



Андрей Николаевич Сурков