

ОТЗЫВ

официального оппонента, ведущего научного сотрудника клинического отдела инфекционной патологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, доктора медицинских наук Усенко Дениса Валериевича на диссертационную работу Борисовой Анастасии Борисовны «Молекулярно-генетическая диагностика и клинические особенности заболеваний, вызываемых представителями рода *Bordetella*», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология, 14.01.09 – инфекционные болезни

Актуальность темы исследования

В 20 веке коклюш был одним из наиболее распространенных детских инфекционных заболеваний и одной из основных причин детской смертности в мире. С началом массовой вакцинопрофилактики заболеваемость коклюшем снизилась более чем на 80% в большинстве стран. Однако с конца 80-х годов XX века как в нашей стране, так и в других развитых странах был отмечен рост числа зарегистрированных случаев коклюша, что было обусловлено значительным сокращением и искусственным ограничением (главным образом путем необоснованных медицинских ограничений) вакцинопрофилактики. Одновременно было отмечено изменение возрастной структуры заболевших – увеличение доли детей первого полугодия и подросткового возраста. До настоящего времени регистрируются крупные вспышки коклюша. На этом фоне стало очевидно, что лишь неполноценностью программы вакцинации детского населения нельзя объяснить изменения возрастной структуры заболевших. При этом в странах Европы и Америки наблюдаются 5-6 летние циклы подъема и снижения заболеваемости коклюшем, как среди детского, так и взрослого населения. Высказываются предположения о том, что это может быть связано с активизацией циркуляции других видов бордетелл, и в частности *B.holmesii*, относительно нового возбудителя, идентифицированного в 1983 году как этиологический агент септицемии и эндокардита у

иммунокомпрометированных лиц, но в дальнейшем была подтверждена высокая частота протекания заболевания с коклюшеподобной симптоматикой. Однако отсутствие специфических диагностических систем затрудняет выявление и мониторинг за данным возбудителем, сообщения о циркуляции которого зафиксированы в Австралии, Северной и Южной Америке, странах Ближнего Востока, ряде европейских стран, но в России не представлены.

Наряду с трудностями лабораторной диагностики (трудности культивирования возбудителя бактериологическими методами, высокая контаминация биоматериала ротоглотки разнообразными и нередко транзиторными микроорганизмами, короткий катаральный период, в течении которого можно обнаружить возбудителя), существенно затруднена и клиническая диагностика, главным образом из-за роста в последние годы числа сочетанных случаев течения коклюша и ОРВИ, другими вирусными и бактериальными инфекциями. Молекулярно-генетические методы позволяют одновременно идентифицировать различные виды микроорганизмов, что ускоряет верификацию диагноза, снижает экономические затраты на проведение диагностики и риски неправильной терапии. В настоящее время в Российской Федерации не разработана молекулярно-генетическая диагностика инфекции *B.holmesii*, а доступная для практического здравоохранения ПЦР-тест система «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» позволяет проводить идентификацию и мониторинг только возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза.

С учетом выше указанных данных, диссертационная работа Борисовой Анастасии Борисовны, имеющая целью разработку методики генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в том числе с выделением *B.holmesii*, и характеристику особенностей клинического течения этого заболевания, по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*, является актуальной.

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

Автором впервые на основе технологии мультиплексной ПЦР-РВ разработана, запатентована (патент на изобретение РФ № 2702240 от 12.10.2018 г.) и апробирована на обширном клиническом материале диагностическая система, позволяющая выявлять и дифференцировать ДНК трех видов бордетелл - *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*. Оценка валидности разработанного диагностического теста продемонстрировала диагностическую чувствительность - 98,8 %, специфичность - 99,2 % и индекс точности - 99,0 %.

Автором впервые в Российской Федерации определена доля *B.holmesii* в этиологической структуре коклюшеподобных заболеваний, в том числе моноинфекция была диагностирована 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.

Впервые описана клиническая картина заболевания, вызванного *B.holmesii*, имеющая в 90% случаях коклюшеподобный характер и протекающая как в детской, так и взрослой популяции в виде типичной легкой формы, а в среднетяжелой форме - только в случаях сочетанного течения с коклюшем. На основании полученных данных были разработаны дифференциально-диагностические критерии заболевания, вызванного *B.holmesii*, по сравнению с классическим коклюшем, вызванным *B.pertussis* (подана заявка на изобретение № 2020142641 от 23.12.2020 г.), предложенные к применению в клинической практике в целях своевременной диагностики заболевания и проведения этиотропной терапии.

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

Работа основана на большом объеме материала, полученном на основании четко сформированного плана и единых критериев отбора, с использованием высокоспецифичных и высокочувствительных микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформатических, клинических и статистических методов исследования, позволивших автору сформулировать выводы на основе принципов доказательной медицины.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость представленной диссертационной работы заключается в расширении сведений о вкладе *B.holmesii* в этиологию коклюшеподобных заболеваний, его клинических проявлениях и особенностях течения у детей и взрослых, что определяет значимость и пути мониторинга за циркуляцией возбудителя на территории Российской Федерации.

Практическая значимость диссертации Борисовой А.Б. состоит в том, что использование разработанной методики генодиагностики на основе ПЦР-РВ в мультиплексном формате, позволяет выявлять ДНК *B.pertussis*, ДНК *B.parapertussis* и ДНК *B.holmesii*, расширяя возможности лабораторного подтверждения диагноза у больных с подозрением на коклюш, а также применяться в системе эпидемиологического надзора и мониторинга за возбудителями коклюша и коклюшеподобных заболеваний на территории РФ.

Результаты диссертационной работы внедрены и используются в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, отражены в аналитической справке «Состояние лабораторной диагностики коклюшной инфекции в России в

2013 - 2017 гг.», использованы при разработке методических материалов «Лабораторная диагностика коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами», докладе на Проблемной комиссии Ученого Совета Роспотребнадзора «Профилактика инфекций, управляемых средствами вакцинопрофилактики» (26.12.2019 г.). Итоги исследования включены в лекционный курс по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, а также используются в учебно-образовательном процессе кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, 2 – в материалах конференций, 1 патент на изобретение РФ, подана заявка на патент.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация А.Б. Борисовой построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список литературы, включающий 219 источников, из которых 43 – отечественных, 176 – зарубежных авторов. Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 таблицами, 32 рисунками.

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 автор обосновывает актуальность исследования, формулирует цель и задачи, отражает научную новизну, теоретическую и

практическую значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» включает три подраздела, отражающие современные данные об актуальности коклюша и коклюшеподобных заболеваний, структуре и свойствах возбудителей, с акцентом на вид *B.holmesii*. Автор подробно анализирует современные методы диагностики коклюша и коклюшеподобных заболеваний, которые существуют и используют в лабораториях для идентификации возбудителей коклюша и коклюшеподобных заболеваний, их достоинства и недостатки. На основании анализа данных литературы автором сделано заключение о перспективности исследования распространенности инфекции *B.holmesii* в популяции детского и взрослого населения в клинических случаях коклюшеподобного заболевания и эпидмониторинга циркуляции возбудителя. Обращает на себя внимание прекрасный стиль изложения, глубокая проработка литературы.

Раздел «Результаты собственных исследований» включает три самостоятельных главы, отражающих весь объем проведенных изысканий. Автором проведен анализ практики применения методов молекулярно-генетической диагностики коклюша в Российской Федерации, делается вывод о необходимости усиления контроля за правильностью взятия клинического материала для проведения ПЦР-диагностики. Важным выводом являются данные об увеличении частоты выявления ДНК бордетелл неустановленного вида в клиническом материале больных с коклюшеподобным синдромом в последние годы.

В третьей главе представлены данные по разработке метода ПЦР-РВ в мультиплексном формате, для одновременного выявления ДНК *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.holmesii*, проведена оценка чувствительности и специфичности разработанной методики ПЦР-РВ. Отдельно автором проанализирована достоверность выявления ДНК *B.holmesii*, которая была идентифицирована с помощью разработанной тест-системы. Применение вновь разработанной методики мультиплексной ПЦР позволило выявить

ДКН *B.holmesii* в клиническом материале 2,3% больных, госпитализированных с подозрением на коклюш, а также сделать вывод о возможности применения данной методики в мониторинге циркуляции возбудителя в рамках эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией на территории РФ.

В четвертой главе приведены данные изучения особенностей клинических проявлений инфекции *B.holmesii*, сравнительные дифференциально-диагностические характеристики в сопоставлении с инфекцией *B.pertussis*, позволяющие говорить о более легком его течении, вероятно определяющую низкую частоту направления на обследование на амбулаторном этапе ведения. В этом ключе особый интерес представляют данные анализа особенностей течения продромального и спазматического периодов при легкой и среднетяжелой формах клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii*. Автором определены основные дифференциально-диагностические критерии коклюшеподобного заболевания, вызванного *B.holmesii*, в сравнении с коклюшем, вызванным *B.pertussis*.

Заключительная глава диссертации посвящена обсуждению основных положений диссертационной работы с привлечением ссылок на современную научную литературу и дискуссии по основным аспектам выполненной работы с авторами ранее опубликованных исследований.

Завершают диссертацию **выводы**, которые соответствуют поставленным задачам, суммируют главные результаты исследования и свидетельствуют о достижении цели работы.

Соответствие специальности

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

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

Вопросы:

1. Какова частота выявления *B.holmesii* среди больных острыми респираторными заболеваниями, не имеющими проявления коклюшеподобного синдрома?
2. Чем объясняется превалирование легких форм моноинфекции *B.holmesii*?
3. Возможно ли носительство *B.holmesii* и какова его роль в эпидпроцессе данной инфекции?
4. Каковы трудности внедрения методов ПЦР-диагностики в клиническую практику и методы их преодоления?

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, в которой на основании выполненного автором исследования содержится решение актуальной научной задачи – совершенствование генодиагностики коклюша и заболеваний, обусловленных другими бордетеллами, в том числе с выделением *B.holmesii*, и характеристика особенностей клинического течения заболевания, вызванного *B.holmesii* по сравнению с коклюшем, вызванным *B.pertussis*.

Работа Борисовой Анастасии Борисовны по актуальности, новизне и практической значимости соответствует 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:

Ведущий научный сотрудник клинического отдела инфекционной патологии Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а, телефон: 8(495)672-11-36, e-mail: cgie@pcr.ru)

доктор медицинских наук



Усенко Денис Валериевич

Подпись д.м.н. Усенко Д.В. заверяю

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а, телефон: 8(495)672-11-29, e-mail: uch@pcr.ru)

кандидат медицинских наук



Никитина Татьяна Станиславовна

« 24 » мая 2021 г.