ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата медицинских наук Андреевской Софьи Николаевны на диссертационную работу Пименовой Алены Сергеевны на тему «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Несмотря на то, что введение массовой иммунизации населения против коклюша и дифтерии привело к значительному улучшению эпидемиологической обстановки по этим инфекциям, оба этих заболевания представляют серьезную угрозу во многих регионах мира. В последние годы в структуре заболеваемости коклюшем увеличилась доля легких и стертых форм среди детей старшей возрастной группы и взрослых, участились случаи выявления бактерионосителей коклюша среди практически здоровых людей, а в 2016 году отмечался рост заболеваемости этой инфекцией, в том числе среди детей до года. Проблема дифтерийной инфекции также продолжает сохранять свою актуальность, так как существует резервуар возбудителя в форме бактерионосительства и эпидемический процесс протекает среди привитого населения.

Кроме того, рост популярности туристических направлений, включающих страны, эндемичные по дифтерии и коклюшу, а также массовая миграция из этих стран в страны Европейского региона, в совокупности с наблюдающимся отказом населения от вакцинации и возможных недостатков бесклеточных вакцин в перспективе может способствовать существенному ухудшению эпидемических показателей по этим заболеваниям.

Несмотря на возрастающую актуальность проблемы коклюша и дифтерии в современном обществе, вопросам диагностики этих двух инфекций уделяется недостаточно внимания. Так, для диагностики коклюша только в последние годы используется комплекс из трех методов: бактериологическоих, серологических и молекулярно-генетических,

применение которых определяется сроком развития заболевания, причем наиболее эффективный из них - молекулярно-генетический подход, существует только в формате ПЦР в режиме реального времени, применение которого предъявляет высокие требования к инфраструктуре лабораторий и к квалификации лабораторного персонала. Также следует отметить, что до сих пор не существует унифицированной молекулярно-генетической тест-системы, а существующие на сегодня диагностикумы различаются по генам-мишеням и способу их детекции, также, вследствие высокой гомологии геномов представителей рода *Bordetella*, возникают трудности достоверной видовой дифференциации. В лабораторной диагностике дифтерийной инфекции используется только бактериологический метод, а молекулярно-генетические методы до сих пор не применяются.

В связи с изложенным актуальность и обоснованность темы диссертации Пименовой А.С., посвященной совершенствованию методов генодиагностики коклюша и дифтерии, не вызывает сомнений. Быстрая идентификация этих возбудителей непосредственно в диагностическом материале позволит выявлять заболевших и бактерионосителей и своевременно назначать адекватную терапию, что будет способствовать поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия по этим инфекциям.

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

Поставленная автором цель и задачи успешно выполнены. Результаты исследования, описанные в диссертационной работе, позволили автору сформулировать положения и выводы, характеризующиеся высокой степенью научной новизны.

Диссертантом оптимизирован метод петлеобразующей изотермической амплификации LAMP, что позволило с высокой эффективностью (диагностическая чувствительность - 99,6%, диагностическая специфичность – 98,7%, индекс точности – 99,4%) выявлять возбудителя коклюша *B.pertussis*

в диагностическом материале. Применение разработанного метода позволило автору обследовать различные группы населения, включающие больных коклюшем, контактных и длительно кашляющих пациентов, и установить процент лиц с разными стадиями течения инфекционного процесса и бактерионосителей.

Автором впервые предложен диагностический подход, основанный на LAMP, который с высокой аналитической чувствительностью ($2,3x10^3$ ГЭ/мл) и специфичностью (100%) позволяет обнаружить ДНК возбудителя дифтерийной инфекции в диагностическом материале.

Впервые предложен подход, позволяющий в формате мультиплексной ПЦР с использованием культур микроорганизмов идентифицировать ДНК токсигенных и нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, и НТТН-штаммов *C.diphtheriae*, для чего автором была предложена оригинальная комбинация из пяти ДНК-мишеней (нуклеотидные последовательности генов дифтерийного токсина, репрессора дифтерийного токсина, амилазы и РНК-полимеразы).

Впервые для использования в практическом здравоохранении был предложен 2-этапный вариант мультиплексной ПЦР, подходящий для работы с биологическим материалом, полученным непосредственно от пациентов с подозрением на дифтерию, обладающий высокой аналитической чувствительностью $2,3x10^3$ ГЭ/мл и 100%-ой аналитической специфичностью.

В целом, научные положения, выводы и рекомендации убедительно аргументированы, четко сформулированы и логически вытекают из проделанной работы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость представленной работы заключается в обосновании применения амплификационных технологий в диагностике коклюша и дифтерии и определении новых методологических подходов для

обследования пациентов с целью выявления бактерионосителей и изучения механизмов бактерионосительства.

Практическая значимость работы состоит в том, что разработанные способы диагностики коклюша и дифтерии позволяют в течение нескольких часов обследовать больных с подозрением на коклюш и дифтерию с возможностью получения ответа и назначения адекватной терапии в течение одного рабочего дня.

Крайне важным представляется возможность применения разработанного молекулярно-генетического метода диагностики *B.pertussis* для обследования очагов коклюшной инфекции на разных сроках существования очага, а не только по первому случаю заболевания, что позволяет в максимально сжатые сроки устанавливать причины длительного кашля в среди детей и взрослых в организованных коллективах.

Выделенные при проведении работы микроорганизмы пополнили Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»: депонировано 60 штаммов микроорганизмов, относящихся к видам *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica*, *C.diphtheriae*, *C.ulcerans* и другим представителям рода *Corynebacterium* с возможностью использовать задепонированные штаммы для осуществления внешнего контроля качества бактериологических исследований, направленных на диагностику возбудителей коклюша и дифтерии и для проведения научных исследований при изучении биологических свойств возбудителей. Созданная рабочая коллекция образцов ДНК микроорганизмов родов *Corynebacterium* и *Bordetella* может быть использована, в частности, для изучения внутривидового и межвидового генетического полиморфизма с целью уточнения вопросов филогении и систематики внутри рода. Материал настоящего исследования используется в рамках работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита,

коклюша и дифтерии на базе 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.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов исследования в настоящей работе не вызывает сомнений, базируется на корректных теоретических положениях, показывающих знание современной литературы по проблеме, и доказывается использованием широкого спектра классических бактериологических, серологических и современных молекулярно-генетических и биоинформационных методов исследования, выполненных на сертифицированном оборудовании, достаточным объемом выборки исследованных штаммов микроорганизмов родов *Bordetella* и *Corynebacterium* и образцов клинического материала, а также достаточным объемом проведенных исследований (567 бактериологических исследований, 159 исследований MALDI-TOF MS, 1544 исследования методом LAMP, 412 исследований ПЦР в классическом формате, 1660 исследований ПЦР в формате мультиплекс, 809 исследований ПЦР в режиме реального времени, 159 секвенирований ПЦР-фрагментов гена *16SrRNA* и 58 – гена *rpoB*). Для определения валидности диагностических тестов использованы стандартизованные методологические подходы. Полученные результаты были подвергнуты качественной статистической обработке с использованием современного программного обеспечения (SPSS 19.0).

Основные положения и выводы диссертации отражены в 11 печатных работах, в том числе в 3 статьях в рецензируемых изданиях. Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на семи профильных научных конференциях.

Оценка содержания, законченности и оформления диссертации

Диссертация Пименовой А.С. изложена на 176 страницах машинописного текста, имеет общепринятую структуру и состоит из введения, обзора литературы, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка цитированной литературы, включающего 253 источника (145 отечественных и 108 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 27 таблицами и 26 рисунками, служащими для наглядного представления и облегчения восприятия результатов работы.

Во введении автор обосновывает необходимость проведения исследования и его актуальность, приводит описание степени разработанности темы, обозначает цель работы и формулирует задачи исследования, указывает новизну, теоретическую и практическую значимость работы, перечисляет основные положения, выносимые на защиту. В отдельном разделе введения автором описаны методология и методы исследования, применявшиеся в работе. Методы изложены детально, грамотно, а их широкий диапазон свидетельствует о высоком методическом уровне работы.

Обзор литературы состоит из двух подразделов и дает представления о современном состоянии лабораторной диагностики коклюшной и дифтерийной инфекции. В разделе описана микробиологическая характеристика бактерий рода *Bordetella*, вызывающих коклюш и коклюшеподобные заболевания, и бактерий рода *Corynebacterium*, вызывающих дифтерию и дифтериеподобные заболевания. Подробно проанализированы методы лабораторной диагностики коклюшной и дифтерийной инфекции. Представленный подробный и критический анализ рассматриваемой проблемы определил направления собственных исследований автора.

Раздел «Результаты собственных исследований» включает 3 главы (со второй по четвертую), которые посвящены решению поставленных в работе задач.

Глава 2 посвящена совершенствованию генодиагностики коклюша. Автор представляет способ оптимизации метода петлеобразующей изотермальной ПЦР, позволяющий выявлять в диагностическом материале ДНК *B.pertussis* в течение 4-5 часов, делает заключение о его аналитической надежности и валидности разработанного метода. По итогам проведенных исследований автор делает вывод о чувствительности, специфичности и диагностической эффективности метода. Далее в главе подробно описаны результаты применения разработанного метода генодиагностики коклюшной инфекции для обследования пациентов на различных сроках заболевания, различных формах клинического течения и на фоне антибиотикотерапии. Особый интерес представляют результаты, показывающие возможность и эффективность применения разработанного метода диагностики у детей до года, которые имеют наибольший риск развития осложнений и тяжелых форм течения заболевания. Автором показана возможность применения разработанного метода для обследования контактных лиц в эпидемических очагах и организованных детских коллективах с длительно кашляющими детьми, а также для обследования семейных очагов коклюшной инфекции. По итогам проведенных исследований автор делает заключение о целесообразности и необходимости применения генодиагностики при обследовании эпидемических очагов коклюша и контактных лиц в границах очага. Полученные данные закреплены в 1-3 выводах диссертации.

В главе 3 собственных исследований представлены результаты разработки метода ускоренной генодиагностики, основанной на петлеобразующей изотермической амплификации, приведены результаты успешной апробации метода на типовых коллекционных штаммах *C.diphtheriae* и клинических изолятах и определены аналитические характеристики представленного способа. Проведенная автором апробация

метода диагностики в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов и на диагностическом материале от больных с различными формами хронического тонзиллита, показали полное совпадение с результатами, полученными бактериологическим методом, что позволяет рекомендовать предложенный метод для обследования случаев с подозрением на дифтерию. Полученные данные закреплены в 4-ом выводе.

Глава 4 посвящена разработке метода генодиагностики дифтерии на основе мультиплексной ПЦР, который позволяет дифференцировать НТТН-штаммы *C.diphtheriae* с различными дефектами гена *tox*, что является необходимым при верификации выделенных на территории России штаммов *C.diphtheriae* при проведении мониторинга возбудителя в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией. Автором приведено подробное описание мишеней и последовательностей праймеров, подобранных с применением биоинформационных технологий с учетом возможности их использования в формате мультиплекс. Безусловной заслугой автора является разработка двух вариантов метода: «расширенного», позволяющего проводить дифференциацию исследуемых штаммов с выделенными чистыми культурами микроорганизмов, который может быть использован в рамках мониторинга за возбудителем в системе эпиднадзора за дифтерийной инфекцией, и «сокращенного», с постановкой в два этапа, который может использоваться в диагностических целях для исследования биологического материала непосредственно с тампона от больного с подозрением на дифтерию или дифтериеподобное заболевание. Для обоих вариантов метода установлена высокая аналитическая чувствительность и специфичность, что свидетельствует о возможности и целесообразности применения данного подхода в практике клинико-диагностических лабораторий. Полученные данные закреплены в 4-6 выводах.

В конце каждой главы раздела «Результаты собственных исследований» автором приведено краткое резюме, суммирующее описанные в главе данные.

В разделе «Заключение» обобщены результаты проведенных исследований. Основные итоги проделанной работы анализируются автором в сопоставлении с отечественными и зарубежными литературными источниками. Анализ полученных данных позволил сделать автору вывод о широкой циркуляции *B.pertussis* среди населения и высоком уровне бактерионосительства. Автором подчеркивается бóльшая чувствительность разработанного метода LAMP по сравнению с существующей коммерческой тест-системой на основе ПЦР в режиме реального времени за счет использования в реакции LAMP трех пар специфических праймеров на один фрагмент генома возбудителя коклюша. Опираясь на полученные результаты, автором предложены алгоритмы проведения лабораторного исследования с диагностической и профилактической целями, включающие разработанные методы генодиагностики, внедрение которых позволит кардинально улучшить лабораторную диагностику дифтерийной инфекции.

Выводы, сформулированные диссертантом, конкретны, соответствуют задачам исследованиям и полностью вытекают из анализа результатов, полученных в диссертационной работе.

В целом, автором было проведено объемное исследование и полностью решены задачи, которые были поставлены в работе. Диссертационная работа Пименовой А.С. является логичным, аргументированным и полноценным научным исследованием. Принципиальных замечаний к диссертации нет. Автореферат диссертационной работы Пименовой А.С. адекватно отражает содержание диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Пименовой Алены Сергеевны на тему «Совершенствование молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики дифтерии и коклюша», , представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является завершенным научно-квалификационным трудом, выполненным под руководством доктора медицинских наук, доцента

Борисовой Ольги Юрьевны, содержащим решение актуальной задачи - совершенствования методов диагностики коклюша и дифтерии, имеющей большое научно-практическое значение для здравоохранения.

Диссертационная работа Пименовой Алены Сергеевны по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями Постановлений 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 наук, а ее автор, Пименова Алена Сергеевна, достойна присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент,
старший научный сотрудник отдела микробиологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

кандидат медицинских наук Андреевская Софья Николаевна
(107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
8(499)785-90-91, andsofia@mail.ru)

16.03.2018

Подпись Андреевской Софьи Николаевны заверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

кандидат биологических наук Шепелькова Галина Сергеевна