

Отзыв официального оппонента
доктора медицинских наук Ивановой Ольги Евгеньевны
на диссертацию Устюжанина Александра Владимировича «Молекулярно-генетический мониторинг носительства неполиомиелитных энтеровирусов в анализе и прогнозе уровня заболеваемости энтеровирусным менингитом в условиях мегаполиса»,
представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность темы диссертационной работы. Вирусные инфекции, вызываемые неполиомиелитными энтеровирусами - представителями семейства *Picornaviridae* рода *Enterovirus*, насчитывающего более 100 серотипов, распространены повсеместно, поражают все возрастные группы населения, характеризуются значительным полиморфизмом и различной тяжестью клинических проявлений – от бессимптомной инфекции (до 85%), легкого простудоподобного заболевания до тяжелых форм нейроинфекций, сепсис-подобного заболевания новорожденных, инфекции, вызванной ЭВ71 типа. Перенесенная энтеровирусная инфекция может быть причиной развития хронических заболеваний - миокардита, диабета 1-го типа. Энтеровирусные инфекции протекают как в форме спорадических заболеваний, так и в форме вспышек, и даже пандемий. Отсутствие средств специфической профилактики, необходимость госпитализации больных, тяжелые последствия перенесенной инфекции с нередкой инвалидизацией, определяют социально-экономическую значимость неполиомиелитных энтеровирусных инфекций. Наиболее частым и одним из тяжелых клинических проявлений неполиомиелитной энтеровирусной инфекции является серозный (асептический, энтеровирусный) менингит (ЭВМ). Особое значение энтеровирусные инфекции, в первую очередь - серозный менингит, имеют для Свердловской области и г. Екатеринбурга. В этом регионе ещё с конца 70-х годов прошлого века наблюдается активный эпидемический процесс, который проявляется в виде спорадической заболеваемости и периодически возникающих вспышек и характеризуется высокими показателями заболеваемости, значительно (иногда в 10 раз) превышающими показатели заболеваемости в России.

В 2009 г. в РФ была принята Федеральная программа «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции», которая продолжается и в настоящее время. Своей целью Программа поставила «Совершенствование мониторинга ... циркулирующих штаммов неполиомиелитных энтеровирусов с целью прогнозирования и своевременного принятия управленческих решений; предотвращение эпидемических подъемов заболеваемости и формирования локальных очагов, снижение числа тяжелых клинических форм энтеровирусной инфекции, приводящих к инвалидизации и летальным исходам». Среди задач, которые поставлены перед Программой – «совершенствование

лабораторной диагностики энтеровирусной (неполио) инфекции» и «совершенствование системы эпидемиологического надзора за энтеровирусной (неполио) инфекцией». За годы реализации этой программы в РФ достигнуты значительные научные и практические достижения, однако прогнозирование заболеваемости остается наименее разработанным направлением.

В связи с вышеизложенным диссертационная работа А.В. Устюжанина, целью которой является оценка эпидемического потенциала этиологических агентов ЭВМ на основе молекулярно-генетического мониторинга носительства НПЭВ среди населения крупного промышленного центра, является весьма актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность определяется большим объёмом исследованного материала (2906 образцов различных клинических материалов), адекватным применением для решения поставленных задач современных молекулярно-биологических методов исследования (ПЦР, секвенирование участков генома), использованием валидированных и зарегистрированных в РФ наборов реагентов, привлечением современных компьютерных программ для филогенетического и молекулярно-эволюционного анализа, использованием для сравнительного анализа последовательностей участков генома референтных последовательностей геномов энтеровирусов, представленных в международной базе генетических данных GenBank, статистической обработкой полученных данных, привлечением для анализа и интерпретации результатов данных многолетних эпидемиологических исследований Управления Роспотребнадзора по Свердловской области. Основные научные положения диссертационной работы прошли экспертизу при опубликовании в виде статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, были доложены и обсуждены на научных конференциях, съездах и совещаниях, в том числе с международным участием, в период 2006-2016 гг.

Научная новизна представленной работы состоит в том, что впервые на примере г. Екатеринбурга и Свердловской области установлены важные для изучения эпидемического процесса и прогноза эпидемиологической ситуации закономерности циркуляции НПЭВ среди определённых контингентов населения. Установлено, что период времени между пиком выявляемости НПЭВ среди здорового населения и пиком показателя заболеваемости ЭВМ может варьировать в широких пределах; количество здоровых вирусносителей, выявленных во время сезонного подъёма заболеваемости, не всегда коррелирует с уровнем заболеваемости. Использование современных методов молекулярного типирования позволило впервые выявить более широкий (по сравнению с

тем, что позволяли традиционные вирусологические методы) спектр серотипов НПЭВ, выделяемых здоровыми вирусоносителями. Филогенетический анализ позволил определить спектр геновариантов серотипов НПЭВ, эндемичных для исследованного региона. На основе полученных результатов автором впервые предложен критерий оценки эпидемического потенциала выявленных штаммов НПЭВ и методика краткосрочного прогноза заболеваемости ЭВМ.

Научная значимость результатов состоит в том, что полученные данные об особенностях циркуляции НПЭВ на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области, данные о типовом составе и эпидемическом потенциале эндемичных и «заносных» штаммов НПЭВ вносят новый вклад в изучении эпидемического процесса неполомиелитных энтеровирусных инфекций. Выполненная работа позволила внести в международный банк генетической информации GenBank 162 нуклеотидные последовательности штаммов НПЭВ, циркулировавших среди населения УФО в период 10 лет (2005-2014 гг.), что, несомненно, имеет существенное значение для дальнейшего изучения циркуляции, эволюции и молекулярной эпидемиологии пикорнавирусов.

Практическая значимость диссертационной работы определяется тем, что полученные автором данные об особенностях циркуляции НПЭВ на территории г.Екатеринбурга и Свердловской области (период времени между пиком выявляемости НПЭВ среди здорового населения и пиком показателя заболеваемости ЭВМ, соотношение здоровых вирусоносителей с уровнем заболеваемости, определение группы наиболее эпидемиологически значимых НПЭВ и установление их филогенетических связей) могут быть применены для оценки и прогноза эпидемиологической ситуации, что имеет большое значение для принятия соответствующих противоэпидемических мероприятий и снижения заболеваемости ЭВМ.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Депонированные в международном банке генетической информации GenBank нуклеотидные последовательности фрагментов генома, кодирующих белок VP1 и VP2, могут быть использованы другими исследователями при выполнении работ различного направления в области вирусологии и молекулярной эпидемиологии пикорнавирусов. Предложенные автором критерий оценки эпидемического потенциала НПЭВ и методика краткосрочного прогноза заболеваемости ЭВМ будут полезны учреждениям Роспотребнадзора г.Екатеринбурга и Свердловской области для оценки и прогноза эпидситуации в отношении ЭВМ. Результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе при чтении лекций в биологических и медицинских ВУЗах.

Содержание работы. Диссертационная работа А.В. Устюжанина построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвящённой описанию материалов и методов, использованных при выполнении работы, 3-х глав собственных исследований, выводов, обсуждения и списка литературы, который включает 190 отечественных и зарубежных источников). Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, дополнена списком сокращений и 2-мя приложениями, иллюстрирована 25 таблицами и 14 рисунками.

Во введении автор логично обосновал актуальность исследования, цель диссертационной работы, четко сформулировал задачи.

Обзор литературы состоит из двух разделов, написан таким образом, чтобы дать понимание об актуальности, целях и задачах исследования. Список литературы насчитывает 190 источников, в том числе 112 отечественных.

В главе «Материалы и методы» в виде таблиц представлены исследованные клинические материалы (образцы фекалий, ликвора, носоглоточных смывов), дана информация о количестве материалов, некоторых характеристиках (возраст, место проживания, клинический диагноз). Подраздел «Методы» содержит подробное описание методических основ диссертационной работы (ПЦР, электрофорез в 2% агарозном геле, секвенирование последовательностей участка генома) и компьютерных программ, использованных для филогенетического и молекулярно-эволюционного анализа.

В трёх главах собственных исследований представлены полученные автором данные о спектре НПЭВ, обнаруженных у больных ЭВМ и у детей с бессимптомной формой инфекции; дана филогенетическая характеристика наиболее актуальных, вызывавших вспышки заболеваний штаммов НПЭВ, циркулирующих в Свердловской области и Уральском Федеральном Округе (ЕСНО30, ЕСНО6, Коксаки А9); проведен сравнительный анализ спектра и частоты выявления НПЭВ у больных ЭВМ и здоровых лиц. На основании данных об инфицировании клинически здоровых детей индикаторной группы (3-6 лет) доминирующими серотипами НПЭВ, вызвавшими повышенную заболеваемость в г. Екатеринбурге в 2012 и 2013 гг., автор предложил рассчитывать показатель риска развития заболевания ЭВМ. Этот показатель (количество инфицированных на 1 случай заболевания) выражается как отношение частоты носительства определённого серотипа (на 1000) к заболеваемости, вызванной этим серотипом (на 1000).

Раздел «Обсуждение» построен логично, нацелен на то, чтобы убедительно обосновать выводы, сделанные автором.

Представленная диссертационная работа свидетельствует о высоком методическом уровне соискателя, написана хорошим научным языком, аккуратно оформлена. Выводы и

автореферат соответствуют материалам диссертации, отражены в 5 печатных работах в журналах, рекомендованных ВАК.

Положительно оценивая представленную диссертационную работу А.В. Устюжанина, необходимо, тем не менее, отметить ряд недостатков.

Есть несколько замечаний к оформлению работы. В рукописи диссертации и автореферате не совпадает п. 5 в разделе «Научная новизна». В таблицах 3.2, 3.3, 6.2 допущены ошибки (неправильно посчитано количество штаммов, количество исследований, показатели заболеваемости на 100 тыс., соответственно). Неправильно указаны номера рисунков на стр. 63, 79, 83, 88 (6.1. вместо 4.2; 6.3 и 6.4 вместо 4.3, 4.4; 6.5, 6.6. вместо 4.5, 4.6; 6.1 вместо 5.1). На рисунках следовало указывать значение осей. Цветная печать сделала бы рисунки более демонстративными.

На наш взгляд в разделе «Обзор литературы» весьма уместно было бы привести более полные, чем это сделано во «Введении», сведения о классификации энтеровирусов, эпидемиологии, клиническом, социальном и экономическом значении заболеваний, вызываемых НПЭВ. Это в значительной степени укрепило бы позицию автора о необходимости мониторинга циркуляции НПЭВ.

В разделе 1.2. Обзора литературы «Индикация энтеровирусов в пробах фекалий лиц с бессимптомной формой инфекции», обсуждая необходимость исследования фекальных материалов от клинически здоровых детей, преимущества использования молекулярно-генетических методов, автор полемизирует не с научными статьями, но, главным образом, с методическими документами (МУ, СП), в том числе – ставшими «историческими», выпущенными в 1971, 1987 гг.

В разделе «Материалы и методы» указаны различные виды клинических материалов, исследованные автором (фекалии, ликвор, носоглоточные смывы), но не описано, как эти материалы готовили для последующего исследования. В табл. 2.2. «Количество обследованных, проживающих на территории Свердловской области и сопредельных областей на наличие в биологическом материале энтеровирусов» не указан вид биологического материала и группа обследованных (по аналогии с табл. 2.1.). В табл. 2.3. «Количество проведенных исследований» фигурирует «культуральная жидкость». Поскольку автор не проводил исследований с использованием культур клеток, следовало указать откуда были получены такие пробы. Среди материалов, которые исследовал автор (табл. 2.1.) указаны образцы фекалий от случаев ОВП. Так как в РФ первичные материалы от случаев ОВП поступают только в лаборатории Национальной лабораторной сети, очевидно, что они были предоставлены автору и в таком случае следовало дать соответствующее разъяснение.

Недочётом работы является то, что автор не представил сведения о том, где и каким образом были собраны клинические материалы от различных групп (больные ЭВМ, ЭВИ, здоровые). Так как автор рекомендует проводить мониторинг циркуляции НПЭВ именно среди здорового населения, хотелось бы знать, как и где может быть организован отбор материала для проведения такого мониторинга, какого количества материалов достаточно, какой должна быть кратность и продолжительность отбора для получения репрезентативных результатов. Эти моменты следовало бы принять во внимание, так как на основании получаемых данных автор высчитывает показатель отношения частоты выявления доминирующего этиологического агента ЭВМ в ликворе больных и в фекальном материале практически здоровых лиц для оценки эпидемического потенциала циркулирующих штаммов НПЭВ и использования «в качестве прогностического показателя вирулентности при оценке эпидемического потенциала обнаруженных штаммов».

На наш взгляд, автор излишне категоричен, когда делает заключение о том, что «результаты вирусологического исследования сточных вод...являются малоинформативными, единственным подходом к получению достоверной оперативной информации об особенностях развития эпидемического процесса, позволяющей приблизиться к решению вопроса прогнозирования уровня заболеваемости, является, по нашему мнению, мониторинг интенсивности циркуляции и спектра НПЭВ среди практически здорового населения» (в частности, на стр. 49). Нельзя игнорировать то, что одним из существенных преимуществ исследования сточных вод является простота организации такого исследования. В последнее несколько лет молекулярные методы весьма широко внедрены в работу вирусологических лабораторий наряду с традиционными вирусологическими методами. Сравнение частоты выявления и количества обнаруженных серотипов вирусов Коксаки А, В, и ЕСНО в пробах сточных вод и образцах фекалий клинически здоровых детей г. Екатеринбурга (табл. 6.1, стр. 101) не совсем корректно, так как эти исследования проводились в разные периоды времени разными методами. Результаты исследования сточных вод, предоставленные Федеральной службой Роспотребнадзора по Свердловской области, были получены в 1998-2010 гг., когда в лабораториях использовали только вирусологические методы. Следовало бы принять во внимание результаты работы, выполненной также в Свердловском регионе, где вирусологический мониторинг за НПЭВ представлен в виде унифицированной системы, включающей надзор за циркуляцией НПЭВ и в объектах окружающей среды, и среди здоровых лиц, тем более, что эта работа приведена в списке изученной автором литературы (№ 81 в библиографии).

Заключение. Диссертационная работа Александра Владимировича Устюжанина «Молекулярно-генетический мониторинг носительства неполиомиелитных энтеровирусов в анализе и прогнозе уровня заболеваемости энтеровирусным менингитом в условиях мегаполиса», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.02 – вирусология, является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов работа соответствует критериям пункта 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» № 842, утвержденному Правительством Российской Федерации 24 сентября 2013 г., а её автор заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук.

Официальный оппонент:

Врио руководителя Института полиомиелита
Федерального государственного научного
учреждения «Федеральный научный
центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»
доктор медицинских наук

О.Е. Иванова

108819, Российская Федерация, город Москва,
поселение Московский, посёлок Института полиомиелита,
домовладение 8, корпус 1
Тел: 8 (495) 841 90 07
Email: ivanova_oe@chumakovs.su

Прочитано рукопись
Устюжанина О.В.
на заседании
диссертационного совета
Федерального государственного научного
учреждения «Федеральный научный
центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»
05.05.2017г.