

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу 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.

Эпидемиологический и вирусологический надзор за энтеровирусной инфекцией (ЭВИ) на территории Российской Федерации осуществляется с 2006 года. В постсертификационный период ликвидации полиомиелита надзор за энтеровирусной инфекцией рассматривается как составляющая часть надзора за полиомиелитом, также как надзор за окружающей средой. Детекция полиовирусов и других энтеровирусов в сточной воде обеспечивают получение важных для Программы ликвидации полиомиелита данных о циркуляции полиовирусов (вакцинных, вакцинно-родственных и диких) среди населения, что гарантирует поддержание свободного от полиомиелита статуса отдельных стран и регионов ВОЗ, а также не менее важной информации о циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов среди населения.

Согласно данным литературы неполиомиелитные энтеровирусы обуславливают как спорадическую, так и вспышечную заболеваемость. Отдельные серотипы могут доминировать в циркуляции в течение нескольких лет, затем исчезать, чтобы появиться годы спустя. Поддержанию циркуляции энтеровирусов среди населения способствуют высокая восприимчивость людей, возможность длительного вирусоносительства и способность вирусов долго сохраняться в объектах окружающей среды. Ежегодно в мире регистрируются сотни тысяч случаев энтеровирусной инфекции различной степени тяжести. В большинстве случаев энтеровирусной инфекции какие-либо симптомы отсутствуют. Эпидемический процесс ЭВИ характеризуется спорадической заболеваемостью, сезонными подъемами и вспышками. Сезонные подъемы заболеваемости, связанной с энтеровирусами (ЭВ), на территории нашей страны отмечаются в летне-осенний период, вспышки ЭВИ могут регистрироваться в течение всего года. Одним из тяжелых проявлений ЭВИ, требующим госпитализации, является энтеровирусный менингит (ЭВМ), возбудителями которого могут быть энтеровирусы ЕСНО разных серотипов (Е6, Е9, Е11, Е13, Е30), вирусы Коксаки А и Коксаки В1-6. В научной литературе описаны эпидемические подъемы заболеваемости ЭВМ в Екатеринбурге в 2000-2007 годах, когда вирусы Коксаки В составили более около 70% от всех изолированных от больных вирусов, а затем с 2008 года в этиологии ЭВМ в Екатеринбурге стали превалировать вирусы ЕСНО.

Значение вирусологического и молекулярно-генетического мониторинга энтеровирусной инфекции очевидно, поскольку именно он позволяет оценить масштабы циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов и определить серотипы неполиомиелитных энтеровирусов, доминирующие в циркуляции среди населения на разных территориях в разные годы. При этом до настоящего времени не полностью ясны особенности циркуляции различных серотипов энтеровирусов и механизмы смены доминирующих в циркуляции серотипов энтеровирусов.

Принимая во внимание выше изложенное, диссертационная работа А.В. Устюжанина, ставящая целью определение роли молекулярно-генетического мониторинга носительства неполиомиелитных энтеровирусов у здоровых детей для оценки эпидемического потенциала этиологических агентов энтеровирусного менингита, является современной и актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность.

В ходе работы было исследовано 2906 проб биологического материала от больных ЭВИ, проживающих на территории Екатеринбурга и Свердловской области, а также 2391 проба фекалий практически здоровых детей из Екатеринбурга в возрасте до 17 лет. Исследование проведено молекулярно-генетическими методами. Индикацию неполиомиелитных энтеровирусов в исследуемом материале проводили с помощью полимеразной цепной реакции с предварительной обратной транскрипцией. Идентификацию обнаруженных вирусов осуществляли методом прямого секвенирования участков генома, кодирующих белки VP1 и VP2 энтеровирусов и дальнейшего сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLAST с последовательностями, депонированными в международном банке генетической информации NCBI GenBank. Филогенетические деревья были построены по алгоритму «ближайшего соседа» (Neighbor-Joining). Достоверность построения филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореплик, достоверными считали построения при индексе поддержки не менее 70%. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США).

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы использованием различных молекулярно-генетических методов исследования и большим объёмом проведённых исследований.

Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов, основанных на результатах молекулярно-генетических исследований не вызывает сомнений, благодаря высокому методическому уровню проведенной работы и статистическому анализу полученных данных.

Научная новизна и теоретическое значение полученных автором результатов.

С помощью молекулярных методов исследования были выявлены этиологические агенты (18 серотипов) энтеровирусного менингита на территории Екатеринбурга и Свердловской области в период с 2008 по 2014 год, определены доминирующие серотипы ЭВ и установлены их генетические варианты. Показано, что подъем заболеваемости энтеровирусной инфекцией был связан со сменой генетических вариантов доминирующих в циркуляции энтеровирусов. Так появление генетического варианта h вируса ЕСНО 30 в 2013 году вызвало подъем заболеваемости ЭВИ, когда показатель заболеваемости достиг 29,2 на 100 тысяч населения.

Использование молекулярно-генетических методов позволило значительно расширить спектр серотипов энтеровирусов, циркулирующих на данной территории, за счет выявления у здоровых вирусоносителей 25 серотипов НПЭВ. Показано, что 12 из этих серотипов были представлены плохо культивируемыми штаммами вирусов Коксаки А, принадлежащих видам А и С энтеровирусов человека.

Было установлено, что во время сезонных подъемов заболеваемости ЭВИ процент вирусывыделителей среди обследованных здоровых детей может быть высоким при низком уровне заболеваемости энтеровирусным менингитом и относительно низким при высоких показателях заболеваемости ЭВМ. Период времени между пиком выявления НПЭВ среди здоровых детей и пиком заболеваемости ЭВМ варьировал от одного до четырех месяцев.

Теоретическое значение исследования заключается в том, что на основании полученных результатов дополнена существующая информация о роли различных серотипов неполиомиелитных энтеровирусов в этиологии энтеровирусного менингита. Молекулярно-генетическим исследованием биологического материала от большого числа здоровых детей в возрасте 3-6 лет на протяжении пяти лет подтвержден тот факт, что бессимптомное носительство неполиомиелитных энтеровирусов является распространенным явлением (10,7%), а также позволило значительно расширить спектр серотипов энтеровирусов обнаруженных у этих детей.

Практическая значимость диссертационного исследования.

Результаты исследования служат для подтверждения важности вирусологического, в том числе молекулярно-генетического мониторинга, в системе эпидемиологического надзора за энтеровирусной инфекцией в крупном промышленном городе. Благодаря молекулярно-генетическим исследованиям была прослежена смена генетических вариантов доминирующих в циркуляции серотипов энтеровирусов, которая совпадала с подъемами заболеваемости энтеровирусным менингитом.

Настоящая работа является первой попыткой сопоставления данных о частоте выявления

доминирующего этиологического агента у больных ЭВМ и у здоровых носителей с целью использования этих данных для оценки эпидемического потенциала штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, циркулирующих на территории мегаполиса. Предложена методика краткосрочного прогноза заболеваемости ЭВМ до конца эпидемического сезона с учетом результатов мониторинга бессимптомного носительства неполиомиелитных энтеровирусов в начале эпидемического сезона.

Филогенетический анализ энтеровирусов ЕСНО 6 и ЕСНО 30, детектированных у больных ЭВМ и вирусоносителей, показал высокое генетическое родство штаммов одного и того же серотипа, обнаруженных в одном эпидемическом сезоне в ликворе больных ЭВМ и фекалиях лиц с бессимптомной формой инфекции.

Практическая значимость диссертационной работы также определяется депонированием в международном банке генетической информации GenBank NCBI 162 нуклеотидных последовательностей штаммов неполиомиелитных энтеровирусов, выявленных у больных ЭВМ и здоровых носителей в разные годы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Депонированные в международный банк генетической информации нуклеотидные последовательности участков генома, кодирующих белки VP1 и VP2 неполиомиелитных энтеровирусов, могут быть использованы другими исследователями, работающими по проблеме энтеровирусной инфекции. Результаты исследования могут служить для обучения студентов медицинских ВУЗов.

Соответствие работы требованиям, предъявляемым к диссертациям.

Диссертация А.В. Устюжанина представляет собой завершённое исследование, содержит необходимые элементы: введение, обзор литературы, главу материалы и методы, три главы собственных исследований, обсуждение, выводы и список литературы. Материалы изложены на 151 странице машинописного текста, иллюстрированы 21 таблицей и 14 рисунками. Список литературы включает 112 отечественных и 78 зарубежных источников.

Обзор литературы, содержащий 2 раздела, обосновывает поставленные автором цели и задачи, которые решаются в разделе собственных исследований.

В главе «Материалы и методы» описаны исследуемые образцы биологического материала от больных и здоровых, использованные методы исследования - молекулярно-генетические и статистические, а также ретроспективный анализ заболеваемости энтеровирусным менингитом в Екатеринбурге в 2006-2014 годах, позволившие автору выполнить запланированные исследования для решения поставленных задач.

В главах собственных исследований приведены данные о том, что заболеваемость энтеровирусным менингитом в период с 2008 по 2014 год была обусловлена широким

спектром неполиомиелитных энтеровирусов, определена доля 18 серотипов в этиологии данного заболевания. Лидирующая роль принадлежала энтеровирусам ЕСНО 30 (29,3%), ЕСНО 6 (22,7%), Коксаки А9 (13,9%), Коксаки В пяти серотипов (12,9%) и ЕСНО 7 (5,5%), суммарная доля остальных восьми серотипов вирусов ЕСНО составила 15,7%.

Молекулярно-генетическими методами у здоровых детей в возрасте 3-6 лет было выявлено 25 серотипов энтеровирусов, что позволило расширить спектр серотипов энтеровирусов, циркулирующих на территории.

Важно отметить, что энтеровирусы, выявленные у больных ЭВМ, принадлежали к виду В, тогда как энтеровирусы, обнаруженные у здоровых детей относились к видам А, В и С энтеровирусов.

Представлены данные анализа филогенетических связей штаммов энтеровирусов доминирующих в циркуляции среди населения серотипов НПЭВ ЕСНО6 и ЕСНО30, обусловившими подъемы заболеваемости ЭВМ в Екатеринбурге, и вируса Коксаки А9, также обнаруженного у больных ЭВМ. Результаты филогенетического анализа показали, что штаммы энтеровируса ЕСНО30, изолированные от клинически здоровых детей в 2013 году по нуклеотидной последовательности, кодирующей белки VP2-VP4, были близко родственны штаммам, обнаруженным в ликворе больных ЭВМ.

Диссертационная работа написана хорошим языком, тщательно оформлена, хорошо иллюстрирована, выполнена на высоком методическом уровне. Выводы и автореферат соответствуют материалам диссертации, которые отражены в 11 печатных работах, в том числе в 5 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК. Работа апробирована на отечественных и международных конференциях.

При общей положительной оценке диссертационной работы А.В. Устюжанина, в которой получены интересные данные о циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов в регионе, следует отметить отдельные недостатки:

Для сравнительного анализа спектра серотипов энтеровирусов, обнаруженных у больных энтеровирусным менингитом (табл. 1) и у здоровых детей (табл. 3) был исследован биологический материал, собранный в разные временные периоды.

Для оценки эпидемического потенциала штаммов энтеровирусов автор предложил формулу, которая выражается соотношением частоты носительства энтеровируса, доминирующего в циркуляции серотипа, и заболеваемости энтеровирусным менингитом, обусловленной этим же серотипом НПЭВ. Диссертанту удалось установить конкретный серотип лишь у половины энтеровирусов, которые были обнаружены методом ПЦР у здоровых детей. С эпидемиологической точки зрения более корректными были бы расчеты показателей на основе штаммов энтеровирусов с установленным серотипом.

В процессе ознакомления с работой возникли вопросы:

1. Почему, вы делаете заключение о низкой чувствительности и информативности исследования сточной воды на основании сравнения данных по исследованию проб сточной воды вирусологическим методом в 1998-2010 годах с данными молекулярно-генетического исследования материала от здоровых носителей, полученными в 2010-2014 годах (табл. 6.1)? Такое сравнение нельзя признать корректным, поскольку эти исследования были проведены разными методами и в разное время.

2. В чем заключается разница таких свойств микроорганизмов как «патогенность» и «вирулентность», какими методами можно определить наличие вирулентности у вирусов.

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 завершённой научно-квалификационной работой, актуальной для современной вирусологии и выполненной на высоком методическом уровне путем исследования большого объема биологического материала.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертация полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует пункту 9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней» №842, утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года, а её автор А.В. Устюжанин заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.02-вирусология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, к.м.н.



Н.И.Романенкова

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
197101, Санкт-Петербург, улица Мира, дом 14.
тел: (812) 233-21-56, e-mail: poliospb@nr3854.spb.edu

Подпись Романенковой Натальи Ивановны удостоверяю:

Учёный секретарь ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, к.м.н.



Г.Ф.Трифорова