

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук Твердохлебовой Татьяны Ивановны на диссертационную работу Морозова Евгения Николаевича на тему: «Перспективы применения методов молекулярной паразитологии в мониторинге за социально значимыми паразитами», представленную к защите в диссертационный совет Д 208.040.15 на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им.И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.11 - паразитология

Актуальность темы диссертации.

Данная работа представляет несомненный теоретический и практический интерес, поскольку в ней рассматриваются актуальные вопросы, связанные с необходимостью внедрения методов современной молекулярной биологии в изучение особенностей различных паразитозов и практику их мониторинга.

Как известно, инструментами, пригодными как для получения точных характеристик изучаемых объектов, так и для массовых обследований населения служат различные виды полимеразной цепной реакции (ПЦР), однако эффективное применение последних в условиях РФ настоятельно требует системного подхода.

Поэтому следует считать вполне оправданной целью диссертационной работы разработку методологии мониторинга социально значимых паразитозов с применением методов молекулярной паразитологии.

Научная новизна результатов исследований.

Соискатель в должной мере оценил возможность применения методов молекулярной биологии в мониторинге паразитозов, вызываемых различными возбудителями протозойных инфекций (малярии, лейшманиозов, криптоспориоза), гельминтными инвазиями и комарами-переносчиками (диروفилариозов).

Были выявлены внутривидовые фeno- и генотипические различия малярийных паразитов *P. vivax*, определяющие географическое происхождение случаев малярии и продолжительность инкубационного периода в организме человека.

Комплексом лабораторных методов было убедительно подтверждено отсутствие источников инфекции в оздоровленных очагах малярии в Республике Таджикистан и в Кыргызской Республике.

Автор оптимизировал ПЦР-диагностику криптоспоридий в водных объектах

окружающей среды, что существенно увеличило эффективность и чувствительность санитарно-паразитологических исследований, необходимых для определения гигиенических стандартов и биологической безопасности.

В работе доказана возможность применения ДНК-диагностики в деятельности Референс-лабораторий при проведении контрольных исследований с целью определения качества работы клинико-диагностических и паразитологических лабораторий.

Автором разработаны методики ПЦР-диагностики трансмиссивного гельминтоза человека - дирофиляриоза и трансмиссивного протозооза на территории Российской Федерации и висцерального лейшманиоза в Республике Узбекистан.

Значимость результатов исследований для науки и практики.

Практическая ценность работы соискателя заключается, прежде всего, во внедрении в практику отечественного здравоохранения методов молекулярной паразитологии, что позволило оптимизировать и повысить достоверность диагностики социально значимых паразитозов и усовершенствовать мониторинг за паразитарными болезнями в РФ. Кроме того, применение этих методов способствовало сокращению трудозатрат при диагностике малярии, лейшманиозов и филяриозов в Референс-лаборатории НИИМП и ТМ.

Материалы исследований автора используются в виде лекций, семинарских и практических занятий и широко апробированы на различных российских и международных конференциях.

Личное участие автора в получении научных результатов состоит в том, что им сформулировано новое научное направление - молекулярная паразитология, уточнены и апробированы подходы к экспериментальному конструированию ПЦР - диагностикумов, спланирована и осуществлена экспериментальная часть работы. Соискатель предложил и обосновал возможность применения молекулярно - паразитологических методов не только в стационарных лабораторных условиях, но и в условиях мобильной паразитологической лаборатории. Автором сформулированы практические рекомендации по использованию молекулярно-биологических методов в системе эпиднадзора за массовыми и социально-значимыми паразитарными болезнями.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертации. По материалам исследований опубликовано 44 печатных работы, из них в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК России - 35, патент Российской Федерации № 2568516 – 1, разделы в 4 монографиях и 4 публикации в зарубежных научных журналах.

Диссертация изложена на 198 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, четырех глав собственных исследований, заключения, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 205 публикаций, из которых 99 иностранных, и трех приложений. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 9 рисунками.

Обзор литературы посвящен анализу современных методов диагностики паразитозов, методологических принципов ПЦР и перспективам использования методов молекулярной паразитологии.

В главе 2 соискатель подробно описывает материалы и методы исследований.

Глава 3 посвящена возможностям и перспективам применения методов молекулярной паразитологии в мониторинге за трансмиссивными паразитами.

В результате проведенной работы соискателем была разработана оригинальная методика ПЦР-диагностики малярийной инфекции, основанная на выделении ДНК из препарата крови «толстая капля» подвергнутого микроскопическому исследованию, т.е. ранее окрашенного по Романовскому-Гимза. Положительной стороной указанной методики является её высокая чувствительность, специфичность и возможность автоматизации процесса при массовых обследованиях населения.

Соискателем вместе с коллегами были разработаны и внедрены в медицинскую практику методики ПЦР-диагностики всех четырех видов малярийных паразитов. Следует отметить, что в настоящее время, в связи с выявлением в странах Юго-Восточной Азии патогенного для человека «пятого вида» малярии, вызываемого *P. knowlesi* (возбудитель малярии обезьян), разрабатываются видоспецифичные праймеры к этому виду.

В этом разделе работы приводится структура олигонуклеотидных праймеров для каждой видоспецифической реакции и оптимизированные режимы амплификации. Кроме того, был апробирован метод одноэтапной ПЦР в реальном времени с флуоресцентной детекцией.

Аналогичная работа была проведена с возбудителями дирофиляриозов. Соискателем были подобраны и синтезированы праймеры для диагностики *D. repens* и *D. immitis* и отработаны режимы амплификации для этих праймеров. Испытания метода ПЦР-диагностики дирофиляриозов, проведенные на сыворотках крови собак с установленным диагнозом, показали 100% эффективность и чувствительность метода.

Последний раздел данной главы посвящен обнаружению возбудителей паразитозов в переносчике. Разработанные методы выделения ДНК позволили автору

успешно применить методику ПЦР для определения зараженности комаров личинками дирофилярий и клещей, зараженных возбудителем болезни Лайма (боррелиоза).

Глава 4 диссертационной работы посвящена возможностям и перспективам применения методов молекулярной паразитологии в мониторинге за нетрансмиссивными паразитами.

Здесь, в первую очередь, нужно отметить работу соискателя по выбору олигонуклеотидных праймеров и оптимизации режимов амплификации в ПЦР для индикации *Cryptosporidium parvum* и *Lambliа intestinalis*. Известно, что дифференциальная диагностика амебиаза невозможна на основании морфологических исследований, поэтому высокой оценки заслуживает отработка параметров полимеразной цепной реакции именно для этого заболевания.

Следует отметить, что в НИИ МПиТМ впервые в РФ была внедрена ПЦР-диагностика бластоцистоза, которая, по мнению соискателя, наряду с методиками ПЦР-диагностики криптоспоридиоза, лямблиоза и амебиаза, имеет важное значение при дифференциальной диагностике кишечных протозоозов.

Последний раздел настоящей главы отведен оптимизации молекулярной диагностики кишечных протозоозов. Коллективом авторов создана и апробирована система ПЦР-диагностики на основе наборов праймеров к четырем основным возбудителям криптоспоридиоза, лямблиоза, амебиаза и бластоцистоза для верификации клинического диагноза.

Глава 5 рукописи диссертации посвящена использованию молекулярно-биологических методов в системе эпидемиологического надзора за основными паразитами. Большая работа была проделана по энтомологическому мониторингу за переносчиками возбудителей дирофиляриозов. Методом ПЦР было исследовано около 7000 самок на зараженность *D. repens* и *D. immitis*. Успешный подбор праймеров и оптимизация режима амплификации позволили создать диагностикум, показавший высокую эффективность при диагностике подкожного дирофиляриоза человека.

Несомненную ценность представляют данные соискателя по эпидемиологической диагностике в потенциальных и активных очагах малярии. Проведенный автором анализ молекулярно-генетической структуры популяций возбудителей и филогенетический анализ выявили три кластера возбудителей в различных ареалах Республики Кыргызстан, что позволило существенно повысить достоверность результатов эпидемиологического анализа.

Следующий раздел диссертации отведен доказательству отсутствия местной

передачи возбудителя трехдневной малярии на территории Республики Таджикистан. Такой вывод был получен на основании использования комплекса трех методов - микроскопической, иммунологической и молекулярной диагностики. ПЦР- диагностика с использованием специфических праймеров убедительно показала отсутствие ДНК малярийного паразита в крови населения оздоровленных очагов малярии.

Далее соискатель приводит данные по применению ДНК-диагностики в очагах висцерального лейшманиоза в Республике Узбекистан. Особенностью этого заболевания является тот факт, что для достоверного результата предпочтительно брать пунктат спинного мозга, а не кровь. Интересным наблюдением автора следует обнаруженный факт наличия ДНК паразита у детей, не имеющих клинических выражений заболевания.

В разделе 5.5 данной главы диссертации рассматриваются результаты скрининга носителей бластоцист среди «декретированных контингентов» медицинских работников Клинического центра Первого МГМУ. Использование праймеров Bhl и Bh2 показало высокую чувствительность полимеразной цепной реакции.

В шестой главе диссертации соискатель рассматривает возможности применения молекулярных методов в системе эпидемиологического надзора за паразитозами. Автор справедливо считает, что повышение доли ГИДР позволяет оптимизировать лабораторную диагностику, улучшить качество дифференциальной диагностики в сложных случаях и при смешанных инвазиях, а также снизить трудозатраты при массовых обследованиях населения. Методы молекулярной биологии позволяют оперативно выявить маркеры лекарственной устойчивости малярийных паразитов, что приводит к сокращению числа смертельных случаев за счет изменения тактики лечения. Также не вызывает сомнений утверждение соискателя о том, что медицинская география значительно выигрывает при комбинировании с молекулярными методами исследований, существенно повышая точность компьютерных карт ареалов паразитарных заболеваний.

Несомненной заслугой Морозова Е.Н. является разработка мобильной паразитологической лаборатории на базе серийного автобуса ПАЗ совместно с коллективом сотрудников МФТИ. В диссертации дается подробное описание структуры этой лаборатории и её возможностей. Создание сети таких лабораторий на обширной территории нашей страны сможет значительно повысить биологическую безопасность населения.

Следует подчеркнуть, что расширение спектра диагностических методов за счет увеличения доли ПЦР в рутинной диагностике паразитарных болезней позволило автору

оптимизировать лабораторную диагностику, улучшить дифференциальную диагностику в сложных случаях и при смешанных инвазиях, а также снизить трудозатраты при массовых обследованиях.

В целом общее впечатление от рукописи диссертации Морозова Е.Н. положительное. Материалы представлены четко и последовательно, получены в результате использования современных методов исследования, содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации. Результаты получены на основании исследования достаточного количества экспериментального материала, однако не вполне достаточно обработаны статистически. Работа написана хорошим литературным языком и легко воспринимается. Соискатель свободно ориентируется в излагаемых проблемах и способен критически оценивать данные и результаты собственных исследований.

Морозов Е.Н. критически проанализировал существующие молекулярно-биологические методики и дал оценку возможностям их применения в медицинской паразитологии, адаптировал и оптимизировал молекулярно-биологические методы с учетом стадийности развития, свойственной исключительно возбудителям паразитарных болезней с различным патогенезом, определяющим локализацию возбудителя в организме больного и в среде обитания человека. Соискатель разработал методические подходы к дифференциальной диагностике кишечных протозоозов и оценил возможность использования методов молекулярной биологии для лабораторной, клинической и эпидемиологической диагностики, а также для санитарной паразитологии.

Принципиальных замечаний по существу рецензируемой работы у меня нет. Между тем считаю необходимым сделать определенные замечания и пожелания.

На мой взгляд, следует более корректно применять некоторые термины, хотя смысл их вполне понятен (например, «ПЦР-отрицательные дети», молекулярная диагностика).

Несмотря на тщательное редактирование, в тексте встречаются отдельные опечатки и стилистические погрешности, устаревшие названия учреждений Министерства здравоохранения, Роспотребнадзора.

Отмеченные мною недостатки не имеют принципиального значения и не снижают научно-практическую значимость диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Морозова Е.Н. является завершенной выполненной на высоком научно-методическом уровне квалификационной работой, имеющей научно-практическое значение, в которой обоснованы актуальность темы, цель и задачи

исследований, а также сформулированы научные подходы к их решению.

Диссертационная работа Морозова Евгения Николаевича на тему: «Перспективы применения методов молекулярной паразитологии в мониторинге за социально значимыми паразитами» по актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему проведенных исследований отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.11 - паразитология.

Официальный оппонент:

Твердохлебова Татьяна Ивановна

доктор медицинских наук

директор ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии»

Роспотребнадзора



Твердохлебова Т.И.

Адрес: 344000, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, д. 119

e-mail: niimicrodouble@yandex.ru

Подпись Твердохлебовой Т.И. удостоверяю

Ученый секретарь ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии»

Роспотребнадзора



Алексанина Н.В.