

ОТЗЫВ ОППОНЕНТА

о научно-практической значимости диссертации ХАМИТОВОЙ Ирины Викторовны на тему: «Лабораторные маркеры парвовирусной инфекции и молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19 в отдельных географических регионах», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы диссертационного исследования

Парвовирусная инфекция – острое инфекционное заболевание преимущественно детского возраста, характеризующееся разнообразными клиническими проявлениями. Наиболее часто парвовирусная инфекция проявляется как инфекционная эритема или «пятая болезнь», получившая своё название из времени, когда был составлен список болезней, провоцирующих детскую сыпь. И действительно, хотя этот маленький ДНК-вирус и был открыт лишь в 1975 г., но начиная с 2002 г., года начала проведения Национальной кампании по элиминации кори и синдрома врождённой краснухи (СВК) как в РФ, так и на территориях Европейского Региона – диагностика парвовирусной инфекции стала очень важной составляющей при проведении дифференциального определения этиологии целого ряда экзантемных заболеваний. Таких, как: корь, скарлатина, краснуха и др. Другой причиной роста, актуальности исследований парвовируса В19 явилось то, что появились новые данные. Так, в 80-х годах стало известно, что В 19 является причиной не только инфекционной эритемы, но и острого артрита у здоровых, в основном людей, а также апластических кризов у пациентов с наследственным микросфероцитозом, серповидно-клеточной и железодефицитной анемией, талассемией (наследственной гемоглобинопатией) и с иммунодефицитными состояниями, что в более чем 2-х процентах случаев заканчивается летально. У беременных женщин инфицирование вирусом В 19 приводит к внутриутробной инфекции, водянке плода и его гибели. И ещё один важный аспект, определяющий несомненную важность данной работы, это то, что «пятая болезнь» встречается в любое время года, чаще, конечно, зимой и весной, вспышки охватывают 20-60 % детей, болезнь очень заразна и особенно заразны больные с апластическими кризами, В 19 – очень стойкий вирус, выдерживает 16 - часовое прогревание при 60 градусах С.

Наличие высокой доли (50% и выше) бессимптомных форм способствует распространению инфекции, а отсутствие во многих странах официального учета случаев заболевания не позволяет в полной мере оценить масштаб распространённости ПВИ в различных географических регионах.

Из-за ограниченного количества соответствующих исследований, сложно также оценить частоту инфицирования PVB19 в группах риска (к которым относятся больные с первичными и вторичными иммунодефицитами, хроническими гемолитическими и инфекционными заболеваниями) и его влияние на течение основного заболевания.

Весьма ограничен перечень работ, посвященных изучению геновариантов PVB19, циркулирующих в России. В базе GenBank депонированы около 4900 нуклеотидных последовательностей участков генома парвовируса B19. Из них лишь 26 последовательностей секвенированы российскими учеными (Лаврентьева и др., 2013, Антипова А.Ю. и др., 2012 и Филатова Е.В. и др. 2012), что не позволяет в полной мере оценивать филогенетические взаимодействия между геновариантами вируса, циркулирующих в разных странах.

Таким образом, диссертационное исследование Хамитовой Ирины Викторовны, посвященное изучению распространения ПВИ в удаленных друг от друга географических регионах и в группах риска, а также молекулярно-генетическому анализу геновариантов PVB19, эндемичных для отдельных территорий Евразийского континента, следует признать актуальным и своевременным.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность научных положений и результатов определяется большим объемом проведенных исследований, применением современных методов, использованием высоко технологичного оборудования и статистической обработкой полученных результатов. Впечатляет география и объем выполненной работы. Хамитовой И.В. лабораторно обследовано 2885 человек, проживающих в РФ и Республике Сербия (Восточная Европа), республиках Средней Азии (Узбекистан, Таджикистан, Казахстан), в Гвинейской Республике (Западная Африка). В целом проведено 5467 лабораторных исследований с применением серологических, вирусологических, молекулярно-генетических методов (ИФА, ПЦР в режиме реального времени, секвенирование ДНК). Результаты статистически обработаны.

Научная новизна исследования

Получены новые знания о генотипах PVB19, циркулирующих в отдельных странах Евразии. По результатам генотипирования все выделенные и проанализированные изоляты отнесены к генотипу 1 субтипу 1А. В базу GenBank впервые депонированы нуклеотидные последовательности ДНК PVB19, изолированные в Республике Казахстан.

На основе выявления лабораторных маркеров ПВИ (IgG-АТ, ДНК PVB19), получены новые знания о распространении ПВИ среди населения

отдельных, географически удаленных друг от друга территорий: в РФ и Республике Сербия (Восточная Европа), в Республике Казахстан, среди мигрантов из Узбекистана и Таджикистана (Средняя Азия), в Гвинейской республике (Западная Африка). Впервые проведено сравнительное изучение распространения ПВИ в разных возрастных группах, определение соотношения серопозитивных PVB19 лиц мужского и женского пола. Показано, что формирование коллективного иммунитета PVB19 в разных регионах характеризуют как общие закономерности, так и различия, обусловленные социальными факторами.

Получены новые сведения о лабораторных маркерах ПВИ в группах риска – у ВИЧ-инфицированных пациентов, больных онкологическими заболеваниями кроветворных органов, лиц, страдающих хронической анемией паразитарной этиологии.

Автором установлено, что инфицирование парвовирусом В19 может замедлять восстановление гематологических показателей больных онкогематологического профиля после проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Также доказано выраженное влияние инфицирования PVB19 на течение малярии у детей младшего возраста.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании генотипирования и филогенетического анализа диссертантом получены данные о циркуляции субгенотипов 1A1 и 1A2 парвовируса В19, генотипа 1А, в отдельных странах Евразийского континента. Выявлены близкие по нуклеотидному составу изоляты на удаленных друг от друга территориях (РФ и Сербия), что может означать их общее происхождение или указывать на пути распространения; а также изоляты, кластеризующиеся в отдельную ветвь с высокой степенью гомологии, что может свидетельствовать о независимой эволюции вируса в данном регионе (Казахстан).

Доказано, что коллективный иммунитет к PVB19 наиболее активно формируется в условиях длительного тесного контакта: в организованном коллективе С.-Петербурга доля серопозитивных к PVB19 лиц составила 82%, достоверно превышая показатель серопревалентности в среднем среди жителей города.

Несомненное практическое значение имеет разработка алгоритмов лабораторной диагностики ПВИ для пациентов из групп риска, основанных на особенностях проявления инфекции в каждой группе, что должно способствовать выбору оптимальной стратегии терапии этих больных.

Также большое практическое значение имеет разработанный диссертантом метод выявления ДНК PVB19 на основе двухэтапной ПЦР, который используется в практической работе центральной клиничко-

диагностической лаборатории ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационной работы представлены в десяти докладах, которые были сделаны на 6 международных и всероссийских конференциях: на VII всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», г. Санкт-Петербург - 8 – 10 декабря 2015г.; на международной конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», г. Санкт-Петербург - 1 – 4 июня 2015 г.; на XI съезде ВНПОЭМП «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», Москва, 16–17 ноября 2017 г.; IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017», Москва.- 18 – 20 апреля 2017г.; международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» Санкт-Петербург, 4 – 6 декабря 2018 г. (4 доклада); Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» 11-12 октября 2018 г., Санкт-Петербург; на XI Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» Санкт-Петербург, 12-13 октября 2020 г.

По теме диссертации опубликовано 32 печатные работы; в том числе 8 статей в реферируемых журналах ВАК Минобрнауки РФ, 7 из них – в журналах, входящих в базу цитирования WoS или Scopus.

Кроме того, материалы диссертационного исследования отражены в главах коллективной монографии, аналитическом обзоре, информационном письме; используются в учебном процессе на кафедре клинической лабораторной диагностики медико-биологического факультета СЗГМУ им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург).

В ходе выполнения диссертационного исследования в международную базу данных GenBank депонировано 30 нуклеотидных последовательностей ДНК RVB19.

Диссертантом оформлена и подана заявка в Федеральную службу по интеллектуальной собственности ФГБУ «Федеральный институт промышленной собственности» на патент на изобретение РФ.

Структура и содержание диссертации

Целью работы было охарактеризовать распространение и молекулярно-генетические особенности возбудителя парвовирусной инфекции среди здоровых лиц и в группах риска разных географических регионов. Задачи исследования логично вытекают из поставленной цели.

Диссертация И.В. Хамитовой имеет традиционное построение, изложена на 157 страницах компьютерного набора; состоит из введения, обзора

литературы, описания использованных материалов и методов, трех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 236 источника на русском и английском языках. Более половины процитированных автором источников опубликованы в последние 5-7 лет. Работа содержит 27 таблиц, 23 рисунка. Материал диссертационного исследования изложен четко и последовательно. Все полученные в ходе выполнения работы результаты статистически обработаны.

В обзоре литературы автор квалифицированно и информативно представил теоретическое обоснование актуальности проделанной работы. Подробно изложены современные представления о структурно-функциональной организации вириона, цикле репродукции парвовируса В19 и географическом распределении генотипов вируса. Представлены современные сведения о патогенезе, клинических проявлениях и методах лабораторной диагностики парвовирусной инфекции. Тщательно проанализированы немногочисленные работы, связанные с выявлением маркеров ПВИ у больных с иммунодефицитами, заболеваниями крови и кроветворных органов, свидетельствующие о недостаточном изучении влияния инфицирования РВВ19 на течение и исход болезни в группах риска. Проанализированы современные сведения о изолятах вируса, выделенных в разных географических регионах, в том числе в РФ. Критический анализ опубликованных работ позволил автору обосновать актуальность выбранной темы, выделить ключевые задачи исследования.

Качественность и достоверность научных результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, во многом определены использованием современных методов исследования, которые описаны в разделе «Материалы и методы». Использование вирусологических, серологических, иммунологических, молекулярно-генетических, статистических методов позволило автору в полной мере решить поставленные задачи.

Изложению полученных результатов посвящены 3 главы собственных исследований.

В первой из них дана сравнительная оценка распространения ПВИ и РВВ19 в некоторых странах Европы, Средней Азии и Западной Африки. Учитывая, что методов специфической профилактики парвовирусной инфекции не разработано, а постинфекционные иммуноглобулины G сохраняются в крови переболевших пожизненно, о распространении данной инфекции можно судить по показателям гуморального иммунитета. Достаточно долго (от нескольких недель до нескольких лет) сохраняется в плазме крови и ДНК вируса. Таким образом, выбор автором этих двух лабораторных маркеров для оценки популяционного иммунитета (IgG-

антитела), и для выявления случаев сравнительно недавно перенесенного заболевания (ДНК вируса), является обоснованным. В рамках диссертационной работы впервые проведено сравнительное изучение распространения ПВИ в разных возрастных группах населения, определено соотношение серопозитивных PVB19 лиц мужского и женского пола отдельных географических регионов. Показано, что формирование коллективного иммунитета PVB19 характеризуют как общая закономерность повышения доли серопозитивных лиц в старших возрастных группах, так и различия, обусловленные социальными факторами. Установлено, что наиболее активное формирование популяционного иммунитета происходит в организованном коллективе (курсанты-военнослужащие) за счет длительного контакта и скрытой циркуляции вируса. Выявлена высокая вирусная нагрузка в образцах плазмы крови лиц из организованного коллектива в концентрации, создающей опасность гемоконтактной передачи возбудителя при гемотрансфузиях.

В следующей главе собственных исследований представлены результаты изучения влияния инфицирования парвовирусом В19 пациентов из групп риска. И.В. Хамитовой статистически достоверно установлено, что выявление лабораторных маркеров ПВИ может ухудшать течение заболевания больных онкогематологического профиля после проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, быть существенным фактором развития нейтро- и тромбоцитопений, фебрильных реакций, замедлять восстановление количества эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови, что показывает необходимость принятия мер, направленных на предупреждение гемоконтактного механизма передачи возбудителя.

С высокой степенью достоверности доказано, что инфицирование парвовирусом В19 может отягощать течение малярии у детей младшего возраста, что позволяет обосновать необходимость проведения дифференциальной этиологической диагностики. Важным практическим аспектом проделанной работы является разработка алгоритмов лабораторной диагностики ПВИ для пациентов из некоторых групп риска, которыми заканчиваются материалы данной главы.

Весьма значимы результаты, представленные в последней главе собственных исследований, посвященной изучению молекулярно-генетических особенностей PV В19, филогенетическому анализу изолятов вируса, циркулирующих на ряде территорий Евразийского континента.

Для определения принадлежности изолятов PVB19 к генотипам был выбран фрагмент генома, включающий консервативный фрагмент по участкам NS1 и VP1 генов (локус NS1 - VP1u), 994 п.о., используемый для проведения аналогичных исследований другими авторами. Диссертантом

показана относительная гомогенность циркулирующих на территории Евразийского континента штаммов, с преобладанием в обследованных популяциях субгенотипов 1A1 или 1A2, распределенных на тех или иных территориях. В то же время выявлены и изоляты, кластеризующиеся в отдельную эволюционную ветвь (Республика Казахстан), впервые депонированные в коллекцию GenBank. В целом, получены новые сведения по вопросам молекулярной эпидемиологии ПВИ.

В главе "Обсуждение" автор на высоком профессиональном уровне анализирует полученные результаты и обсуждает их в контексте с имеющимися литературными данными.

Шесть выводов, которыми заканчивается работа, аргументированы и полностью подтверждены полученными результатами.

Содержание диссертации полностью соответствует паспорту научных специальностей 03.02.02 – вирусология и 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика.

ЗАМЕЧАНИЯ

- 1. Нет статистической обработки результатов по выявлению ДНК РVВ19 в различных возрастных группах (рис.1).**
- 2. Очень мелкий шрифт дендрограммы, характеризующей отношения между исследованными изолятами парвовируса В19, выделенными в трёх регионах в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями.**

Замечания не влияют на общую положительную оценку работы.

ВОПРОСЫ

Какие отечественные средства диагностики должны быть сконструированы для продолжения работ по определению маркёров парвовирусной инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Хамитовой Ирины Викторовны на тему: «Лабораторные маркеры парвовирусной инфекции и молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса В19 в отдельных географических регионах» является законченной научно-квалификационной работой, в которой доказана высокая медицинская значимость парвовирусной инфекции, в том числе для групп риска.

По актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждении ученых степеней» ВАК РФ, (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Хамитова Ирина Викторовна заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика.

Отзыв подготовлен:

Заместителем заведующего отделом

Вирусологии им.О.Г. Анджапаридзе

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова

главным научным сотрудником

лаборатории эпидемиологического анализа

и мониторинга инфекционных заболеваний,

доктором биологических наук, профессором

Н.В. Юминовой

Подпись Н.В. Юминовой заверяю

Уч. Секретарь ФГБНУ НИИВС им.

И.И. Мечникова, кандидат медицинских

наук

С.Н. Жирова

