

Отзыв

официального оппонента – доктора медицинских наук, профессора Ботвинкина Александра Дмитриевича на диссертацию Зайковой Ольги Николаевны на тему «Эпидемиологическая ситуация по бешенству в Российской Федерации в период с 2013 по 2019 годы и молекулярно-генетические особенности его возбудителя», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.02.02 – эпидемиология и 03.02.02 - вирусология.

Актуальность темы диссертационного исследования. Актуальность исследования определяется высокой социально-экономической значимостью бешенства, необходимостью совершенствования эпидемиологического надзора за бешенством, а также лабораторной диагностики этой инфекции в Российской Федерации (РФ). Повышает актуальность работы участие РФ в программе ВОЗ по глобальной ликвидации заболеваний людей бешенством в результате заражения от собак к 2030 г. Очевидно, что качество эпидемиологического надзора и эффективность борьбы с бешенством тесно связаны с внедрением в практику современных вирусологических и молекулярно-биологических методов.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций. Научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации О.Н. Зайковой, в достаточной степени обоснованы. В работе представлены результаты исследований, подтверждающие положения, выносимые на защиту. Выводы логически связаны с задачами и опираются на результаты собственных исследований.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций. Для эпидемиологического анализа использованы официальные статистические сводки по заболеваемости бешенством санитарно-эпидемиологической и ветеринарной служб РФ, а также данные ВОЗ. Для лабораторных исследований использованы адекватные методы, сертифицированные расходные материалы, современное оборудование и компьютерные программы. Выполнена статистическая обработка данных. В результате исследований получены новые научные данные, в том числе следует особо подчеркнуть определение и депонирование нуклеотидных последовательностей генома 26 изолятов вируса бешенства, описание последовательностей праймеров и специфических маркерных мутаций в геноме вируса, обнаружение оригинального кластера изолятов вируса бешенства из Таджикистана. Таким образом пополнены знания в области молекулярной эпидемиологии бешенства в РФ.

Практическая значимость диссертации. При участии соискателя и на основе результатов диссертации разработано и утверждено на учрежденческом уровне 3 методических документа по вирусологическим, серологическим и молекулярно-генетическим методам исследования. Обоснована важность использования этих методов в практике работы отечественных медицинских и ветеринарных лабораторий для целей совершенствования эпидемиологического надзора за бешенством.

Структура диссертации, ее содержание и последовательность изложения материала. Рукопись диссертации (на 166 страницах текста) включает введение, четыре главы (обзор литературы, описание материалов и методов, результаты собственных исследований и их обсуждение), заключение, список использованной литературы, состоящий из 83 отечественных и 62 зарубежных источников, и приложение.

Введение написано лаконично и включает в себя необходимые разделы, предусмотренные ГОСТ Р 7.0.11-2011. Выбивается из общего стиля изложения формулировка положения 4. Существенных замечаний по введению нет.

Обзор литературы достаточно подробно освещает состояние исследований по проблеме бешенства в целом, написан с привлечением актуальных научных данных и позволяет оценить положительно базовые знания соискателя по избранной теме. Но следует отметить, что некоторые разделы обзора (патогенез, клиника, структура вириона и др.) практически не связаны с собственными исследованиями. Хотелось бы увидеть в обзоре более подробный анализ литературы по эпидемиологии бешенства (в том числе по молекулярной эпидемиологии) в РФ и соседних странах, использованию методов определения антител к вирусу бешенства и др., чтобы подчеркнуть новизну выполненных соискателем исследований. Кроме того, в обзоре встречаются, как теперь ясно, ошибочные сведения со ссылками на старые источники (например, о заражении бешенством спелеологов в пещерах, «заселённых мириадами летучих мышей» и вирусе «болезни безумной собаки»).

Глава «Материал и методы». Основу материала по заболеваемости людей и животных бешенством составляют обработанные данные из статистических сводок за два пятилетних периода, в том числе данные по соседним с Российской Федерацией странам. Для лабораторного исследования использованы образцы крови 75 человек, 84 пробы головного мозга животных из очагов бешенства, коллекционные образцы вирусов и очищенные ПЦР-продукты полевых изолятов. Включено в анализ большое

количество нуклеотидных последовательностей фрагментов генома лиссавирусов, депонированных в базах данных. Приведено подробное описание вирусологических и молекулярно-генетических методов исследования, реагентов, расходных материалов и оборудования, что свидетельствует о хорошей лабораторной подготовке соискателя. К сожалению, описание эпидемиологических методов занимает всего 5 строк, и отсутствуют ссылки на методическую литературу по этому направлению. Объем материала и набор методов достаточны для проведения качественного исследования.

Глава 3. Это единственная глава с результатами собственных исследований.

Раздел 3.1 посвящен описанию динамики и структуры заболеваемости бешенством. Наиболее оригинальные и значимые данные этого раздела относятся к сравнительной характеристике заболеваемости в Европейской части России и в соседних странах (табл. 10-11), в результате чего установлены существенные различия в активности очагов и продемонстрировано значение различных подходов к надзору за бешенством в разных странах. В частности, эти данные указывают на недостаточное внимание к проблеме бешенства летучих мышей на фоне широко распространения бешенства среди хищных млекопитающих в РФ. По мере снижения заболеваемости людей бешенством после укусов собаками, кошками и дикими хищными животными эпидемиологическое значение резервуара лиссавирусов среди рукокрылых будет возрастать. Данные о структуре заболеваемости животных и распределению заболевших людей по возрастным группам особой новизной не отличаются, так как аналогичные данные примерно за эти же годы имеются в ряде опубликованных работ, в том числе процитированных в главе 1. Следует обратить внимание на отсутствие заболеваний людей бешенством в Республиках Средней Азии в табл.10. По-видимому, это результат отсутствия соответствующих статистических данных в использованных соискателем сводках, что следовало бы отметить в примечании. В таблицах по сравнению структуры заболеваемости (табл. 12, 13) результаты статистической обработки были бы уместнее, чем в главе 2.

Раздел 3.2 посвящен результатам применения нового для российской лабораторной практики FAVN-теста для определения антител к вирусу бешенства в крови привитых антирабическими препаратами. Это ценный опыт, так в последнее время в практическом здравоохранении исследования по оценке гуморального иммунитета у привитых в РФ должным образом не

проводились, несмотря на требования, прописанные в разных инструктивно-методических документах, включая наставление к вакцине. Результаты исследования демонстрируют возможности рекомендованного ВОЗ метода и положены в основу методических рекомендаций, подготовленных с участием автора. Внедрение этого метода в практику здравоохранения весьма актуально.

В разделе 3.3 представлены данные по сравнительному использованию рутинной биопробы на белых мышах и заражения культуры клеток нейробластомы для выделения вируса бешенства. Из описания не вполне понятна научная значимость полученного результата, поскольку давно известно, что культуры клеток можно использовать в диагностике бешенства, и что интенсивность накопления вируса будет больше после пассажа через мозг белых мышей и серийных пассажей в культуре.

Раздел 3.4 посвящен генотипированию лиссавирусов. Основным результатом исследования является подбор двух новых праймеров, с помощью которых можно выявлять РНК лиссавирусов, циркуляция которых к настоящему времени установлена в Евразии. Для этого проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена нуклеопротеина 8 видов лиссавирусов, в том числе более 40 штаммов вируса бешенства. Выбранные праймеры и подобранная для них программа амплификации были успешно применены для детекции специфической РНК нескольких видов лиссавирусов в пробах методом ОТ-ПЦР с последующим секвенированием ампликонов.

Раздел 3.5 Судя по результатам, это один из основных разделов диссертации, включающий как вирусологические исследования, так и исследования по молекулярной эпидемиологии. В разделе представлены результаты секвенирования фрагментов гена N вируса бешенства, и существенным научным вкладом является получение и депонирование 26 новых фрагментов генома изолятов вируса из Европейской части России и Таджикистана. Выполнен филогенетический анализ полученных последовательностей в сопоставлении с большим набором аналогичных фрагментов генома вируса бешенства из различных регионов РФ и других стран. В результате дополнены представления о разнообразии и географическом распространении вариантов вируса бешенства на территории РФ. Представляет научный интерес выделение подгруппы изолятов вируса бешенства из Таджикистана в качестве оригинальной ветви на филогенетическом древе.

Глава 4. В этой главе результаты собственных исследований сопоставлены с опубликованными данными. В некоторой степени, это компенсирует недостаточно полное освещение публикаций других авторов по направлениям собственных исследований в главе 1 «Обзор литературы». К сожалению, обсуждение не всегда подчеркивает новизну выполненных исследований. Так, после прочтения раздела 4.3 складывается впечатление, что просто воспроизведена ранее описанная методика, а вытекающее из обсуждения заключение о недостатках биопробы на мышах и преимуществах клеточной культуры общеизвестно. После обсуждения результатов в разделе 4.4 можно сделать вывод, что исследования соискателя опровергают существование вируса Лагос, но, очевидно, это относится только к конкретному образцу биоматериала, который имелся в распоряжении автора. Циркуляция вируса Лагос в Африке - неопровержимый факт.

Таким образом, результаты собственных исследований представлены в главе 3. Она детально структурирована и состоит из 5 основных разделов, из которых два первых и, частично, последний посвящены эпидемиологическим исследованиям; разделы 3.3, 3.4 и, частично, 3.5 включают в себя результаты вирусологических исследований. В главе 4 обсуждение полученных результатов с привлечением ранее опубликованных данных проведено в соответствии с основными разделами главы 3. В автореферате результаты собственных исследований объединены по этим же 5 разделам, и соответствующие подзаголовки выделены шрифтом. Оглавление работы соответствует ее содержанию. Принципиальных замечаний по структуре и оформлению работы нет.

Соответствие диссертации Паспортам научных специальностей. В формулировках цели и задач исследования, а также положений, выносимых на защиту, прослеживаются два направления - эпидемиологическое и вирусологическое. В главе 2 «Материал и методы» представлены данные по заболеваемости людей и животных, а также материал для вирусологической экспериментальной работы; использовались как эпидемиологические, так и вирусологические методы. Из пяти выводов два определенно имеют эпидемиологическую направленность. В совокупности это служит достаточным обоснованием для защиты работы по двум специальностям. Результаты исследования соответствуют поименованным во введении и автореферате пунктам Паспортов научных специальностей 14.02.02 - эпидемиология и 03.02.02 - вирусология.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Основные результаты, полученные

соискателем, опубликованы. Всего по теме диссертации опубликовано 22 научных работы, в том числе 3 - в журналах, индексируемых в Scopus. Приведенные в автореферате публикации автора представлены в РИНЦ и активно цитируются (Индекс Хирша = 8, число цитирований >170). Обращает внимание, что в списке опубликованных работ преобладают журналы ветеринарного профиля, не имеющие отношения к специальности «эпидемиология». Полностью соответствуют обеим заявленным специальностям статьи в журнале «Вопросы вирусологии».

Замечания. По диссертации имеются отдельные замечания редакционного характера и вопросы.

1. В главе 2 (в таблице 2 и некоторых других) приведены неточные названия видов животных; желательно приводить научные (латинские) названия. В этой же главе представляется излишним подробное описание статистических расчетов (табл. 6-9), и включение в них результатов исследования.

2. В главе 3 (раздел 3.2, обнаружение антител к вирусу бешенства) некоторые таблицы (табл.14,15) и графики имеют «протокольный» вид и были бы более выразительными после группировки и статистической обработки данных.

3. Заключительная часть вывода 2 тривиальна и указывает лишь на то, что апробированный метод способен выявлять снижение и повышение уровня антител.

4. Имеется неточность в формулировке вывода 5: получается, что с 1987 г. на изучаемых территориях циркулировали вирусы бешенства, для которых «предковая» форма выявлена только в 2001-2001 гг.

Вопросы.

1. В чем новизна фрагмента исследования, посвященного сравнению биопробы на мышах и заражения культуры клеток нейробластомы? Известны ли соискателю аналогичные исследования?

2. Обладают ли подобранные соискателем праймеры какими-то преимуществами в сравнении с рекомендованными в руководствах по диагностике бешенства (например, по Heaton P., 1997)?

Заключение.

Диссертация Зайковой Ольги Николаевны на тему «Эпидемиологическая ситуация по бешенству в Российской Федерации в период с 2013 по 2019 годы и молекулярно-генетические особенности его возбудителя», представленная к защите на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальностям 14.02.02 – эпидемиология и 03.02.02 – вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения актуальных научных задач в области эпидемиологии и вирусологии – изучена современная эпидемиологическая ситуация по бешенству в РФ и выявлены молекулярно-генетические особенности возбудителя бешенства. Полученные результаты имеют значение для теории и практики эпидемиологии и вирусологии.

По своей актуальности, новизне полученных данных и практической значимости результатов работа Зайковой Ольги Николаевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, №748 от 02.08.2016 г., №1024 от 28.08.2017 г. №1168 от 01.10.2018г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор - Зайкова Ольга Николаевна по совокупности представленных материалов, актуальности темы, ее теоретической и научно-практической значимости, ценности научных материалов и личному вкладу, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.02.02 – эпидемиология и 03.02.02 – вирусология.

Заведующий кафедрой эпидемиологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения высшего образования «Иркутский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, доктор медицинских наук,
профессор (шифр специальности 14.02.02 –
эпидемиология).



А.Д. Ботвинкин

664003, г. Иркутск, ул. Красного
восстания, 1. Тел. (395-2) 28-15-67
e-mail: botvinkin_ismu@mail.ru

Подпись Ботвинкина Александра
Дмитриевича ЗАВЕРЯЮ
14.09.2021



Л.В. Кузнецких