

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Шербины Анны Юрьевны на диссертацию Арnaudовой Кристины Шотаевны «Возможности полимеразной цепной реакции в ранней диагностике лепры и в мониторинге лепрозного процесса», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.10 – кожные и венерические болезни, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность избранной темы

Лепра – хроническое инфекционное заболевание, проявляющееся различными клиническими формами от лепроматозной до туберкулоидной лепры, в основе развития которых лежат иммунологические сдвиги с преимущественным подавлением клеточного иммунного ответа. Иммунологические механизмы лежат и в основе таких инвалидизирующих осложнений при лепре, как специфические полиневриты, развивающиеся в результате антигенной общности *M. leprae* и шванновских клеток. Несмотря на то, что основным путем передачи заболевания является воздушно-капельный путь, считается, что лепра развивается только у лиц с генетически обусловленным вторичным иммунодефицитом.

Крайне медленное развитие лепры, многообразие ее клинических проявлений, сходство со многими кожными, некоторыми инфекционными, соматическими, нервными и другими заболеваниями часто приводит к ошибкам диагностики и позднему выявлению больных. Несвоевременная диагностика лепры ведет к инфицированию окружающих, появлению новых случаев заболевания и повышает вероятность развития у больного инвалидизирующих осложнений. Заболеваемость лепрой в очаге зависит от естественной резистентности населения, от числа больных с открытыми формами болезни, от степени контакта с больным лепрой. При повышенной восприимчивости заболевание может развиваться и при кратковременном

контакте. Выявление заболевания на ранней стадии болезни способствует не только предотвращению распространения заболевания, но и развития инвалидизирующих осложнений.

Сложность диагностики лепры заключалась в отсутствии роста *M. leprae* на искусственных питательных средах, а, следовательно, и достоверной идентификации возбудителя лепры. И только с развитием и внедрением таких методов диагностики инфекционных заболеваний, как полимеразно-цепная реакция (ПЦР) открылись перспективы для наиболее достоверной лабораторной диагностики лепры. Однако следует отметить, что в нашей стране метод ПЦР и его модификации для идентификации возбудителя лепры практически не применяется и не регламентирован. Поэтому диссертационная работа Арнаутовой К.Ш., направленная на разработку и внедрение отечественных тестов идентификации возбудителя лепры, в частности на основе ПЦР, будет способствовать ранней диагностике заболевания, выявлению случаев лепры среди лиц, контактирующих с больными, и лиц, въезжающих из эндемичных по лепре стран, а также дополнительным подтверждающим тестом в диагностике лепры и оценке эффективности лечения. В связи с изложенным, диссертационная работа Арнаутовой К.Ш., направленная на разработку тест-систем на основе метода ПЦР для диагностики лепры и мониторинга лепрозного процесса, является актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в рецензируемой диссертации, обоснованы системным анализом работ в области развития и современном состоянии методов диагностики лепры на основе ПЦР, а также оценки эффективности противолепрозного лечения. В работе рассмотрены существующие методы идентификации возбудителя лепры и методы с использованием ПЦР, их преимущества и недостатки. В

процессе исследования применялись как имеющиеся зарубежные тест-системы для идентификации *M. leprae*, так и разработанные оригинальные тест-системы на основе ПЦР для детекции возбудителя лепры и мониторинга лепрозного процесса. Для оценки достоверности результатов исследования выполнена статистическая обработка всех экспериментальных данных. Таким образом, предложенные в диссертационной работе научные положения, выводы и рекомендации, можно признать обоснованными.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Автором разработаны тест-системы на основе ПЦР для ранней диагностики лепры и мониторинга лепрозного процесса. Определены оптимальные условия и методы пробоподготовки клинического материала и экстракции ДНК/РНК возбудителя лепры, подобраны и сконструированы ДНК-мишени к последовательностям *M. leprae*, отработаны режимы амплификации при проведении ПЦР. Установлены чувствительность и специфичность стандартных методов исследования и ПЦР-анализа. Проведен сравнительный анализ результатов, полученных при бактериоскопическом и гистологическом методах детекции *M. leprae* и разработанных тест-систем.

Оценка содержания работы

Диссертация построена по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов, списка литературных источников. Общий объем работы составляет 131 страницу машинописного текста, иллюстрированный материал содержит 3 рисунка и 17 таблиц.

Во введении автор кратко обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, научную новизну и практическую ценность работы.

В обзоре литературы автор демонстрирует не только глубокие знания, касающиеся ситуации заболеваемости лепрой как в мире, так и в России, но и дает подробную информацию о существующих методах лабораторной диагностики лепры их достоинствах и недостатках. Основной акцент при рассмотрении современных методов диагностики лепры автор делает на оценке специфичности и чувствительности различных праймеров для детекции *M. leprae* и рассматривает возможности их использования в мониторинге эффективности проводимой терапии, в контроле за распространением лепры и наблюдением за контактными лицами.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» дана характеристика 275 обследованным лицам, в том числе 87 больных лепрой с различными формами заболевания и различной активностью процесса, 66 здоровых доноров, 42 здоровых лица, контактных с больными лепрой и 67 мигрантов. Кроме того, в качестве группы сравнения с больными лепрой, имеющими трофические язвы, представлена группа больных сахарным диабетом, осложненным трофическими язвами (13 больных). Приведены методики исследования: пробоподготовка; выделение ДНК из исследуемого материала; амплификация ДНК/РНК.

В третьей главе «Результаты собственных исследований» проведена идентификация кислотоустойчивых микобактерий, выделенных от больных лепрой, с использованием метода ПЦР с гибридизацией. Автором показана не только наибольшая чувствительность данного метода по сравнению с бактериоскопией, но и возможность обнаруживать в биоптатах, скарификатах кожи и трофических язвах от больных лепрой помимо *M. leprae* и другие виды микобактерий, в частности, *M. malmoense* и *M. avium*. Также третья глава посвящена собственной разработке методов как идентификации *M. leprae* с применением праймеров к 16S рРНК, так и определения жизнеспособности *M. leprae* для оценки эффективности проводимого лечения. Установлена высокая чувствительность и

специфичность разработанного метода. Автором получен патент на изобретение: «Способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции». Кроме того, автором разработан метод идентификации возбудителя лепры с помощью ПЦР с использованием праймеров к RLEP-последовательности *M. leprae*, предназначенного для обследования населения на лепру. Полученные результаты продемонстрировали информативность данного теста, экономичность по сравнению с импортными тест-системами, высокую чувствительность и специфичность. На данную тест-систему автором получен патент «Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции».

В разделе «Обсуждение» автор анализирует результаты собственных исследований и сопоставляет их с данными литературы, демонстрируя возможности и преимущества разработанных ПЦР-тест-систем для идентификации *M. leprae* с использованием отечественных компонентов, реактивов и оборудования в сравнении с зарубежными аналогами.

Выводы сформулированы четко и логично, отражают результаты работы и полностью соответствуют поставленным задачам. Все вышесказанное позволяет сделать вывод о высоком методическом уровне и завершенности диссертационной работы в целом. Принципиальных замечаний нет, некоторые стилистические и орфографические опечатки не снижают достоинства работы.

**Заключение о соответствии диссертации критериям,
установленным Положением о присуждении ученых степеней**

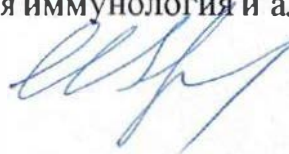
Таким образом, диссертационная работа К.Ш. Арnaudовой «Возможности полимеразной цепной реакции в ранней диагностике лепры и в мониторинге лепрозного процесса» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук Дуйко Виктор Васильевича, доктора медицинских наук

Сароянц Людмилы Валентиновны, содержащей новое решение актуальной научной задачи – совершенствование диагностики лепры, мониторинга лепрозного процесса и оценки эффективности лечения на основе создания отечественных тест-систем с использованием идентификации возбудителя лепры методом полимеразной цепной реакции. Содержание диссертации, её актуальность, научная новизна и практическая ценность, выводы и рекомендации, автореферат и приведенные публикации в должной степени соответствуют требованиям п. 9 Положения о присуждении учёных степеней, утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016г., № 748 от 02.08.2016г.).

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор РАН,
заместитель директора Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий ФГБУ НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Минздрава России

(код специальности 14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология)



Щербина А.Ю.

г. Москва,

15.11.2019

+7 9032291923

Mail shcher26@hotmail.com

Подпись Щербины А.Ю. заверяю:

Начальник отдела кадров ФГБУ НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Минздрава России



Терехова Н.И.