

●ТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Соколовой Татьяны Вениаминовны 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 темы диссертации

Несмотря на то, что заболеваемость лепрой в России носит спорадический характер, число новых случаев из года в год увеличивается. Существенно, что в эндемичных по лепре странах заболеваемость не снижается, несмотря на усилия ВОЗ по глобальному внедрению комбинированной химиотерапии. При этом число лиц, прибывающих в Россию по туристическим или рабочим визам из этих стран, постоянно увеличивается. Следует учитывать, что при инфицировании лепрой патологический процесс у человека протекает тяжело. В процесс вовлекаются кожа, слизисты оболочки, периферическая нервная система и внутренние органы. Лабораторная диагностика лепры на сегодняшний день включает бактериоскопию соскобов со слизистой носа и скарификатов кожи, а также гистологическое исследование биоптатов кожных поражений. Воспроизводимых методов культивирования возбудителя лепры на искусственных питательных средах не существует. *M. leprae* могут быть обнаружены только путем прямого микроскопирования. При многобактериальных формах заболевания этот метод достаточно информативен, поскольку *M. leprae* обнаруживаются легко и в большом количестве в скарификатах кожи, а при распространенном процессе – и в соскобах со слизистой носа. При малобактериальных формах лепры и на начальных стадиях развития заболевания при микроскопировании выявить возбудитель крайне сложно, а иногда и невозможно. Существенно, что обнаруженные при бактериоскопии кислотоустойчивые микобактерии не могут быть достоверно иденти-

фицированы как *M. leprae*, т.к. морфологически они не отличаются от других видов микобактерий. Это сильно затрудняет постановку диагноза.

В связи с вышеизложенным, актуально диссертационное исследование, направленное на разработку тест-систем на основе метода ПЦР для диагностики лепры, мониторинга лепрозного процесса и эффективности лечения.

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

Работа выполнена в лабораторно-экспериментальном отделе Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИИЛ»). Следует отметить несколько тактически правильных подходов автора при планировании дизайна диссертационной работы.

1. На первом этапе изучена возможность выявления молекулярно-генетическим методом широкого спектра кислотоустойчивых микобактерий, в том числе и *M. leprae*, в различном биологическом материале от больных лепрой.

2. На втором этапе проводилась разработка тест-системы на основе ПЦР для идентификации возбудителя лепры в клинических образцах.

3. На третьем этапе были разработаны тест-системы для определения жизнеспособности *M. leprae* с использованием ПЦР для оценки эффективности противолепрозной терапии для скринингового обследования населения на лепру.

Научные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации, базируются на анализе и систематизации данных литературы, в которых отражены методы диагностики лепры и оценки эффективности ее лечения. В работе рассмотрены существующие методы идентификации возбудителя лепры и молекулярно-генетические, их преимущества и недостатки. В процессе исследований применялись как готовые тест-системы для диагностики

лепры, так и разработаны оригинальные тест-системы на основе ПЦР для детекции *M. leprae* и мониторинга лепрозного процесса.

Грамотный методологический подход к решению поставленных задач, последовательность их решения, достаточное количество фактического материала и его качественная статистическая обработка позволили сделать обоснованные выводы и сформулировать практические рекомендации. Положения, выносимы на защиту, обоснованы, четко сформулированы, соответствуют цели и задачам исследования и отражают их результаты.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность полученных результатов подтверждается большим клиническим материалом. Автором обследовано 275 человек, с том числе 87 больных с различными формами лепры и активностью процесса; 42 здоровых лица, контактных с больными лепрой; 67 мигрантов и 66 здоровых доноров. Группу сравнения составили 13 больных сахарным диабетом, осложненным трофическими язвами. Изучено 423 клинических образца: 48 биоптатов кожи, 232 соскоба со слизистой носа, 86 скарификатов с поверхности кожи, 28 соскобов с трофических язв и 29 сывороток крови. Экстракция ДНК из различного клинического материала для определения эффективности ее выделения проведена 8 методами с использованием отечественных и зарубежных тест-систем. Проведена идентификация 16 образцов возможной сопутствующей микобактериальной флоры в патологическом материале.

Статистическая обработка результатов исследованием современных, адекватных методов. Для определения достоверности различий при сравнении двух независимых выборок использовали критерий Манна-Уитни при $p < 0,05$. При анализе связей внутри групп применялся линейный парный коэффициент ассоциации Пирсона (r_n). Выполняли подсчет чувствительности и специфичности разработанных тест-систем.

Научная новизна исследований очевидна. Автором впервые разработан высокочувствительный метод детекции ДНК *M. leprae* в биоптатах и скарификатах кожи больных лепрой. Впервые разработана отечественная тест-

система с использованием ПЦР для скринингового обследования населения на лепру в соскобах со слизистой поверхности носа (патент на изобретение «Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции» №2641060). Впервые разработана отечественная тест-система на основе ПЦР для определения жизнеспособности *M. leprae* с целью оценки эффективности противолепрозной терапии (патент на изобретение «Способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции» (№2688156).

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

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, выбраны и сконструированы ДНК-мишени к последовательностям *M. leprae*, подобраны режимы амплификации при проведении ПЦР. Определены 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. Следовательно, разработанная тест-система для идентификации возбудителя лепры явится дополнительным диагностическим тестом при скрининговом обследовании мигрантов и контактных по лепре лиц, а также дополнительным подтверждающим тестом для диагностики лепры и мониторинге лепрозного процесса. Оценка эффективности проводимого лечения на основе определения жизнеспособности *M. leprae* дает возможность проводить адекватный контроль эффективности противолепрозной терапии. Идентификация *M. leprae* в различных биологических образцах будет способствовать уточнению механизмов передачи лепры и сохранения источников инфекции, что в итоге позволит усовершенствовать противоэпидемические мероприятия. Результаты исследования внедрены в практику работы клиники «НИИ по изучению лепры.

Результатам научных исследований опубликованы 18 печатных работ, среди них 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК, 2 статьи в Scopus, получено 2 патента на изобретения: №2641060, №2688156» Минздрава России. Материалы диссертационного исследования доложены на научных форумах различного уровня, в том числе за рубежом: на XVIII International Leprosy Congress (г. Брюссель, 16-19 сентября 2013г.), XIX International Leprosy Congress (г. Пекин, 18-21 сентября 2016 г.);

Личное участие автора в получении научных результатов

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, сформулированы цели и задачи, научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту. Разработан дизайн исследования. Вся экспериментальная работа и статистическая обработка полученных данных выполнены самостоятельно. Лично написаны статьи, настоящая диссертация, подготовлены доклады и презентации на научных конференциях.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, выводов, списка литературных источников. Диссертация изложена на 131 странице компьютерного текста, иллюстрирована 3 рисунками и 17 таблицами. Список литературы включает 218 источников, в том числе 15 отечественных и 203 зарубежных.

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

В главе «**Обзор литературы**», состоящем из 3 глав, автор демонстрирует глубокие знания изучаемой проблемы. В первом разделе содержатся сведения, касающиеся ситуации заболеваемости лепрой в мире. Подробно

беркулезных микобактерий. В результате исследования сделан вывод, что частота встречаемости микобактерий в содержимом трофических язв у больных лепрой значительно выше, чем у больных сахарным диабетом. Кроме того, у 20% больных лепрой в язвах обнаруживались *M. leprae*.

Раздел 2 «Разработка метода идентификации возбудителя лепры с использованием праймеров к 16S рРНК» третьей главы посвящен разработке метода молекулярно-генетической идентификации *M. leprae*, выделенных от больных лепрой. Установлена высокая чувствительность и специфичность метода ПЦР с применением праймера к 16S рРНК при обнаружении *M. leprae* в различных клинических образцах. Данный метод способен детектировать и идентифицировать *M. leprae* не только в материале, где возбудитель лепры определялся бактериоскопически, но и в скарификатах, биоптатах кожи, соскобах со слизистой носа и трофических язв больных лепрой, где результаты бактериоскопии были отрицательными. Базируясь на полученных результатах, автор делает заключение о возможности использования разработанной тест-системы с применением праймера к 16S рРНК для диагностики активно протекающей лепрозной инфекции.

В 3 разделе «Разработка метода определения жизнеспособности *M. leprae* с помощью ПЦР для оценки эффективности лечения лепры» третьей главы также представлен разработанный способ оценки эффективности лечения лепры с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией и использованием праймера к 16S рРНК. Результаты, полученные автором, убедительно показывают, что предлагаемый способ идентификации *M. leprae* можно использовать для контроля эффективности противолепрозной терапии на основе оценки жизнеспособности возбудителя лепры. Предлагаемый способ идентификации *M. leprae* прост в исполнении, выполняется на отечественном оборудовании и отличается повышенной чувствительностью. На данную тест-систему автором получен патент: «Способ оценки эффективности лечения лепры с помощью полимеразной цепной реакции».

даны сведения о количестве новых случаев заболевания, как во всем мире, так и в России. Во втором разделе дана характеристика рода микобактерий, а также лабораторные методы идентификации микобактериальных инфекций. Представлена информация о методах лабораторной диагностики лепры, приведены их недостатки. Третий раздел обзора литературы посвящен молекулярно-генетическим методам идентификации микобактерий. Представлены сведения о специфичности и чувствительности ПЦР при лепре. Описаны методы экстракции ДНК *M. leprae* и возможности использования различных праймеров для детекции *M. leprae*. Подробно дана информация о роли ПЦР в диагностике лепры, в оценке жизнеспособности *M. leprae*, мониторинга эффективности проводимой терапии, в контроле за распространением лепры в различных регионах и наблюдением за контактными лицами.

В главе «**Материалы и методы исследования**» дана характеристика всех обследованных лиц, в том числе больных лепрой, здоровых доноров, здоровых лиц, бывших в контакте с больными лепрой и обследованных мигрантов. Группы сравнения представили больные сахарным диабетом с наличием трофических язв. Приведены методики исследования: пробоподготовка; выделение ДНК из исследуемого материала; амплификация ДНК/РНК.

Результаты собственных исследований изложены автором в главе 3. В первом разделе главы 3 «Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных от больных лепрой» представлена молекулярно-генетическая идентификация микобактерий, выделенных от больных лепрой. Установлено, что в биоптатах и скарификатах кожи от больных лепрой помимо *M. leprae* обнаруживаются и другие виды микобактерий, в частности, *M. malmoense* и *M. avium*. Показано, что у больных лепрой в скарификатах кожи методом ПЦР микобактерии лепры выявлялись чаще, чем при бактериоскопии. Также в 1 разделе главы 3 представлены результаты идентификации микробиоты содержимого трофических язв больных лепрой и сахарным диабетом. В содержимом трофических язв как у больных лепрой, так и у больных сахарным диабетом были идентифицированы различные виды нету-

В 4 разделе «Разработка метода идентификации *M. leprae* с помощью ПЦР с использованием праймеров к RLEP-последовательности для скринингового обследования населения на лепру» третьей главы представлена разработка метода идентификации возбудителя лепры с помощью ПЦР с использованием праймеров к RLEP-последовательности *M. leprae*, предназначенного для обследования населения на лепру. Полученные результаты подтверждают, что предлагаемый способ идентификации микобактерий лепры прост в исполнении, неинвазивен, информативен и значительно дешевле импортных тест-систем, выполняется на отечественном оборудовании и отличается повышенной чувствительностью, точностью и скоростью выполнения. На данную тест-систему автором получен патент «Способ идентификации ДНК микобактерий лепры с помощью полимеразной цепной реакции».

В разделе «Обсуждение» дан анализ результатов собственных исследований и их сравнение с данными литературы. Он демонстрирует возможности и преимущества разработанных ПЦР-тест-систем для идентификации *M. leprae* с использованием отечественных компонентов и реактивов в сравнении с зарубежными аналогами.

Выводы соответствуют задачам исследования и являются логическим завершением проведенных исследований. Практические рекомендации имеют прикладной характер. Содержание автореферата полностью отражает основные положения и результаты диссертационного исследования. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Имеющиеся некоторые недочеты в оформлении диссертации не влияют на общее впечатление о проделанной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа Кристины Шотаевны Арнаутовой «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 Саро-

