

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Рудакова Николая Викторовича на диссертационную работу Колясниковой Надежды Михайловны «Совершенствование эпидемиологического надзора за клещевым энцефалитом и бактериальными инфекциями, передающимися иксодовыми клещами», представленную к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.2.2. Эпидемиология и 1.5.10. Вирусология.

Актуальность темы диссертационного исследования. Несмотря на интенсивное изучение и многочисленные исследования, посвященные этиологии, эпидемиологии и профилактике инфекций, этиологические агенты которых передаются иксодовыми клещами, проблема заболеваемости данными инфекциями остается актуальной для здравоохранения Российской Федерации (РФ) и в настоящее время. Это обусловлено широким распространением, большим разнообразием возбудителей клещевых трансмиссивных инфекций (КТИ), выявлением ранее неизвестных патогенных микроорганизмов, например, *Borrelia miyamotoi*, вызывающих часть случаев безэритемных форм клещевых боррелиозов (КБ) – боррелиоз, вызываемый *Borrelia miyamotoi* (БМ). Общность паразитарных систем, включая переносчиков и резервуарных хозяев клещевых патогенов человека, определяет существование сочетанных природных очагов КТИ, а, следовательно, возникновение микст-форм заболеваний. Поэтому изучение клинических и эпидемиологических проявлений как моно-, так и микст-инфекций, разработка методик и алгоритмов ранней дифференциальной диагностики трансмиссивных КТИ вирусной и бактериальной природы для своевременной адекватной терапии является актуальной задачей для

совершенствования эпидемиологического надзора за инфекциями, передающимися иксодовыми клещами.

В свете изложенного диссертационная работа Колясниковой Н.М., посвященная совершенствованию эпидемиологического надзора за клещевым энцефалитом и бактериальными КТИ в условиях сочетанности природных очагов, является своевременной и актуальной.

Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Достоверность полученных результатов диссертационного исследования, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций определяется длительным периодом наблюдения (17 лет, 2005-2021 гг.) за проявлениями эпидемического процесса клещевого энцефалита (КЭ), болезни Лайма (БЛ) и 9-летним (2013-2021 гг.) периодом официальной регистрации случаев моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ); большим количеством исследованных индивидуально иксодовых клещей (более 7000) из 12 регионов РФ (6 федеральных округов), а также пациентов (более 1000) из Свердловской области в период 2009-2021 гг.; выделением штаммов вируса КЭ (11 штаммов) с оценкой их нейровирулентных и нейроинвазивных свойств в экспериментах на лабораторных животных (белые мыши и сирийские хомяки), изолятов (штаммов) *Borrelia miyamotoi* с определением чувствительности к антибактериальным препаратам (24 штамма); разнообразием методов исследования (эпидемиологические, серологические, вирусологические, бактериологические, молекулярно-биологические, иммуногистохимические), адекватной статистической обработкой материалов с использованием, как параметрических, так и непараметрических методов, и привлечением современных компьютерных программ для филогенетического и молекулярно-генетического анализа.

Сформулированные в диссертации положения, выводы и рекомендации обоснованы, корректны и полностью соответствуют поставленным задачам.

Практические рекомендации нацелены на решение задач усовершенствования информационной и диагностической подсистем эпидемиологического надзора за КТИ. Основные научные положения работы прошли экспертизу при публикации их в виде статей, тезисов, глав монографий в отечественных и зарубежной печати (всего 77 печатных работ), учебного пособия по клещевому энцефалиту, а также при обсуждении докладов соискателя на научно-практических конференциях различного уровня (более 40 докладов).

Научная новизна исследования и теоретическая значимость научных результатов.

Впервые проведена оценка социально-экономического бремени КЭ и БЛ в РФ, определен ущерб в денежном эквиваленте и число потерянных лет трудоспособной жизни (DALY) за один календарный год.

Разработан и оптимизирован протокол, позволивший впервые в мире выделить из крови пациентов и закрепить в культуре *in vitro* изоляты (штаммы) *B. miyamotoi*. Определены возможности молекулярно-биологических и серологических методов специфической лабораторной диагностики БМ.

Научно обоснован и усовершенствован алгоритм дифференциальной диагностики КЭ и бактериальных инфекций, передающихся клещами рода *Ixodes*. На основании молекулярно-биологического мониторинга показано широкое распространение возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами в 12 различных регионах РФ из 6 федеральных округов, а также высокая частота микст-инфицирования переносчиков на отдельных территориях.

Определена этиологическая роль и патогенный потенциал доминирующего на территории РФ сибирского подтипа вируса КЭ. Впервые описана морфологическая картина поражений в центральной нервной системе, вызванных данным подтипом возбудителя, а также изучены нейровирулентные и нейроинвазивные свойства современных штаммов

вируса КЭ сибирского подтипа. Впервые при остром и хроническом КЭ у вакцинированных пациентов выявлены три варианта динамики гуморального иммунитета (по IgG): сероконверсия, стабильные титры антител, обратная (негативная) динамика антител, а также определены критерии специфической лабораторной диагностики КЭ у привитых.

Автором определены вероятные причины выраженного снижения заболеваемости КЭ, БЛ, МЭЧ и ГАЧ в РФ в целом и по субъектам в период пандемии COVID-19, а также дана оценка современной эпидемиологической ситуации по данным инфекциям, характеризующаяся тенденцией к снижению заболеваемости за 17-летний период (2005-2021 гг.).

Впервые на модели Свердловской области проведена комплексная дифференциальная диагностика КЭ и схожих с ним по эпидемиологическим и клинико-лабораторным данным бактериальных клещевых инфекций, вызываемых клещами рода *Ixodes* (БЛ, БМ, МЭЧ и ГАЧ), изучена этиология безэритемных форм КБ на эндемичной территории, определены молекулярно-генетические характеристики возбудителей.

Полученные автором новые знания об инфекциях, передающихся иксодовыми клещами вирусной и бактериальной природы на всех уровнях развития патологического процесса, вносят существенный вклад в теоретические основы эпидемиологии, биологии возбудителей и способствуют использованию этих знаний для эффективного воздействия на эпидемический процесс.

Практическая значимость исследования.

Практическая ценность диссертации определяется совершенствованием информационной и диагностической подсистем эпидемиологического надзора за КТИ с позиции повышения качества эпидемиологической диагностики, основанной на проведении молекулярно-биологического мониторинга клещей-переносчиков, лабораторного подтверждения каждого случая заболевания КЭ, БЛ, БМ, ГАЧ и МЭЧ, и внедрения алгоритма их дифференциальной диагностики. Впервые разработаны, апробированы и

зарегистрированы две тест-системы ПЦР в режиме реального времени для одновременного выявления 4 клещевых патогенов (вируса КЭ, боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis/Ehrlichia muris*), а также *Borrelia miyamotoi* в клещах и клиническом материале. Выделены штаммы вируса КЭ, *B. miyamotoi* от больных и клещей, нуклеотидные последовательности которых депонированы в международный компьютерный банк данных GenBank.

Основные положения диссертационного исследования нашли отражение в нормативных документах федерального уровня, регламентирующих эпидемиологический надзор и профилактику КТИ (2 документа), внедрены в практику работы ООО МО «Новая больница» г. Екатеринбурга (Городской центр природно-очаговых инфекций), на базе которой проходила, в том числе, апробация разработанных тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени, а также в научную и педагогическую работу в аспирантуре по специальности «Вирусология» в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), используются в лекционном материале сертификационных курсов усовершенствования специалистов различного профиля, проводимых на базе ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы.

Автором осуществлено планирование этапов исследования, проведен анализ данных отечественной и зарубежной литературы, а также лично или при его участии выполнены эпидемиологические, вирусологические, микробиологические, молекулярно-биологические, иммунологические исследования, статистический анализ. Колясниковой Н.М. проведена оптимизация условий и апробация разработанных ПЦР-методик в режиме реального времени для проведения молекулярно-биологического мониторинга иксодовых клещей и лабораторной диагностики КТИ. Автором

лично проведены систематизация, анализ и обобщение полученных результатов проведенных исследований. Вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: постановка задач, экспериментальная работа, включая экспедиции в эндемичные очаги по КТИ, обсуждение результатов, публикации, в том числе в международных базах данных, внедрение результатов работы в практическое здравоохранение.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора.

Диссертационная работа изложена на 560 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 9 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 108 таблицами и 156 рисунками. Список цитируемой литературы содержит 988 источников, из них отечественных – 325, зарубежных – 663.

Во введении автором обоснована актуальность проблемы, представлена степень ее разработанности, определены цель и задачи исследования, сформулированы положения, определяющие новизну исследования, теоретическую и практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту, представлены сведения об объеме и структуре диссертации.

Глава 1. Обзор литературы написан хорошим научным языком, демонстрирует глубину погружения автора в проблему и включает 5 разделов, в которых освещены современные аспекты этиологии, экологии, эпидемиологии, патогенетических закономерностей, клинических проявлений, диагностики, специфической профилактики и лечения КЭ, БЛ, боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*, МЭЧ, ГАЧ, микст-инфекций, и включает эпидемиологический надзор за инфекциями, передающимися иксодовыми клещами. В конце главы представлено заключение о необходимости совершенствовании эпидемиологического надзора за вышеперечисленными инфекциями.

В главе 2 (материалы и методы) автор подробно описывает план исследования, структурирует выполненные в процессе исследования этапы работы, объем выполненных исследований и подробно характеризует использованные методы, что позволяет при необходимости воспроизвести весь ход исследования. Работу отличает разнообразие использованных методов: эпидемиологические, вирусологические, бактериологические, молекулярно-биологические, серологические, иммуногистохимические, методы статистической обработки данных. Весь ход исследования, объем и методы изображены в виде таблицы, что существенно облегчает восприятие представленных материалов. Особо отмечу комплексный и многоэтапный характер диссертационного исследования.

В главе 3 впервые представлена подробная характеристика проявлений эпидемического процесса (интенсивность, многолетняя динамика с оценкой цикличности, территориальное распределение по федеральным округам, структура заболеваемости) КЭ, БЛ, МЭЧ и ГАЧ в РФ в целом и субъектах РФ и сравнительная оценка проявлений эпидемического процесса КЭ и БЛ на отдельно взятой эндемичной территории – Свердловской области (включая возрастную, половую, социальную структуру) за 17-летний период (2005-2017 гг.). Установлено, что несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости данными инфекциями на территории РФ, современная эпидемиологическая ситуация характеризуется сохранением эпидемиологического неблагополучия. В период эпидемиологического неблагополучия по новой коронавирусной инфекции COVID-19 (2020-2021 гг.) по сравнению с предыдущим 2019 г. отмечено резкое снижение заболеваемости КЭ в 1,8 раза и БЛ – в 2 раза. Следует отметить, что в период пандемии COVID-19 число пострадавших от присасывания иксодовых клещей снизилось только в 1,2 раза. Установлено выраженное снижение заболеваемости МЭЧ и ГАЧ за 9-летний период их официальной ситуации (2013-2021 гг.). Выявленные тенденции в динамике заболеваемости автор связывает, прежде всего, с резким перераспределением объемов оказания

медицинской помощи в пользу больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19, снижением объемов лабораторной диагностики по выявлению возбудителя и соответственно регистрации случаев заболевания, а также отсутствием настороженности врачей-клиницистов в отношении «новых» для нашей страны инфекций – МЭЧ и ГАЧ, отсутствием в настоящее время на рынке зарегистрированных серологических тест-систем для выявления антител к возбудителям МЭЧ и ГАЧ.

Глава 4 посвящена впервые проведенной в РФ оценке социально-экономического бремени КЭ и БЛ. Разработана математическая модель, описывающая возможные затраты, связанные с изучаемыми заболеваниями, а также количество потерянных вследствие данных заболеваний лет жизни с поправкой на нетрудоспособность и снижение качества жизни (DALY). Расчет затрат произведен на когорту больных, заболевших в одном календарном году для РФ в целом и для отдельных субъектов РФ. Установлено, что источники экономических потерь определяются спецификой заболеваний: это и текущие медицинские расходы на пребывание в стационаре, и текущие немедицинские расходы (выплата пособий по временной нетрудоспособности, упущенный вклад в производство), а также отложенные немедицинские расходы, возникающие вследствие хронизации заболевания и смерти пациентов, если такие события имеют место. Основная доля в структуре расходов по формам заболевания КЭ приходится на очаговую форму (81,2%), по видам затрат – на немедицинские расходы (86,2%); в медицинских расходах ведущую роль играют текущие затраты на лечение КЭ в остром периоде, в немедицинских – отложенные потери, связанные с инвалидизацией больных в результате заболевания и смертностью больных в трудоспособном возрасте. При БЛ основная доля расходов приходится на эритемную форму заболевания (75,0%), на безэритемную форму – только четверть всех расходов (25,0%), по видам затрат – на немедицинские расходы (55,8%), в медицинских расходах ведущую роль играют текущие затраты на лечение БЛ в остром периоде, а

отложенные медицинские расходы обусловлены хронизацией заболевания, отложенные немедицинские затраты образуются из-за временной нетрудоспособности больных с хроническим течением болезни. Различия в размере социально-экономического бремени КЭ и БЛ между регионами обусловлены как числом заболевших, так и стоимостью медицинской помощи. Установлено, что несмотря на различия в экономических показателях между регионами (финансирование медицинской помощи, валовый региональный продукт и средняя заработная плата), прослеживается прямая связь между фактическими средними затратами и общим количеством заболевших по регионам.

В главе 5 автор представляет результаты разработки и апробации ПЦР тест-систем в режиме реального времени для одновременного выявления возбудителей КЭ, БЛ, ГАЧ и МЭЧ и отдельно *V. miyamotoi*, роль которого в структуре инфекций, передающихся иксодовыми клещами в РФ на сегодняшний день изучена мало. Тест-системы зарегистрированы на территории РФ, широко внедрены в практику работы учреждений Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения, и легли в основу выполнения 4 и 5 задач диссертационного исследования, результаты представлены в главах 6 и 7.

Глава 6 посвящена молекулярно-биологическому мониторингу распространения вируса клещевого энцефалита и возбудителей бактериальных инфекций, передающихся клещами рода *Ixodes* (*I. persulcatus* и *I. ricinus*). При исследовании иксодовых клещей с помощью разработанных тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени из 12 регионов 6 федеральных округов РФ (Центрального, Уральского, Приволжского, Сибирского, Северо-Кавказского, Северо-западного) и за ее пределами – на территории Республики Казахстан установлено, что изученные патогены встречаются практически во всех обследованных регионах. Все пять патогенов были выявлены на территории 4 субъектов РФ – Вологодской, Свердловской, Курганской, Иркутской областей и на всех изученных

территориях Республики Казахстан. Установлено, что до 45,8% иксодовых клещей могут быть одновременно заражены двумя и более патогенами. Следовательно, факт присасывания клеща следует рассматривать как возможную сочетанную инфекцию.

Глава 7. В ходе многолетнего комплексного исследования, проведенного на территории Свердловской области установлено, что в структуре КТИ, помимо КЭ и БЛ, представляют эпидемиологическую значимость такие ранее неизвестные инфекции, как БМ, ГАЧ и МЭЧ. Проведенное секвенирование позволило дать молекулярно-генетическую характеристику возбудителям клещевых боррелиозов (боррелии группы *B. burgdorferi* s.l. – *B. garinii*, боррелии группы *B. miyamotoi* s.l. – азиатский геновариант), вирусу КЭ (сибирский подтип, субгенотип «Заусаев») на территории области. Установлены общие черты и различия в эпидемиологии изученных инфекций на современном этапе. Интересным является факт, что в большинстве случаев длительность присасывания иксодовых клещей была не более суток. Клиническая симптоматика при инфекциях, передающихся иксодовыми клещами, оказалась сходной, исключение составляет эритемная форма БЛ. При микст-инфекциях в том или ином сочетании частота клинических симптомов сильно варьировала. Варьировали лабораторные показатели крови и мочи, хотя выявлены и статистически значимые различия. В данной главе представлена информация о выделенных штаммах *B. miyamotoi* и их чувствительности к антибактериальным препаратам. Автором сделано заключение, что диагностика изученных заболеваний может основываться на комплексе клинико-эпидемиологических данных, показателей лабораторной диагностики, а подтверждение диагноза должно проводиться только с учетом серологических и молекулярно-биологических методов исследования.

В главе 8 представлены результаты комплексной специфической (этиологической) лабораторной диагностики КЭ, БЛ, БМ, МЭЧ, ГАЧ, включающей данные молекулярно-генетических и серологических

исследований. Описаны три варианта гуморального иммунного ответа у вакцинированных пациентов против КЭ (сероконверсия, стабильные титры антител и обратная сероконверсия). При стабильных титрах антител доказательством инфекции, вызванной вирусом КЭ, является выявление IgM, антигена вируса КЭ методом ИФА и вирусной РНК методом ПЦР в СМЖ пациентов с диагнозом КЭ. Особое значение имеет изоляция вируса с последующим его генотипированием.

Глава 9 посвящена изучению этиологической роли и патогенного потенциала доминирующего на территории РФ сибирского подтипа возбудителя. Установлена этиологическая роль сибирского подтипа при тяжелейших очаговых формах КЭ с генотипированием вирусной РНК, изолированной непосредственно из мозга погибших больных, а также типированием выделенных штаммов. Показано, что летальные исходы КЭ, связанные с сибирским подтипом возбудителя, регистрируются в различных регионах, где он циркулирует. Описаны два редких случая летального исхода у вакцинированных пациентов против КЭ. Автором проведена оценка нейроинвазивных и нейровирулентных свойств штаммов вируса КЭ на белых мышцах и сирийских хомяках и сделано заключение о том, что современные штаммы вируса высоконеуринвазивными и нейровирулентными в опытах на лабораторных животных.

В главе 10 представлены данные по обоснованию совершенствования молекулярно-биологического и серологического мониторингов в системе эпидемиологического надзора за клещевым энцефалитом и бактериальными инфекциями, этиологические агенты которых передаются клещами рода *Ixodes*. Автором на основании полученных результатов, представленных выше, сформирован двухэтапный алгоритм дифференциальной диагностики КЭ, БЛ (эритемная, безэритемная формы), БМ, ГАЧ и МЭЧ, включающий результаты молекулярно-генетического исследования переносчика и собственно алгоритм дифференциальной диагностики (эпидемиологический

анамнез, клиническая симптоматика, общелабораторные, молекулярно-биологические и серологические методы исследования).

В заключении подведены итоги работы с кратким изложением ее основных положений.

Выводы, сформулированные в диссертации, несомненно, имеют высокую степень обоснованности, логично вытекают из ее содержания и полностью соответствуют поставленным задачам.

Перспективы дальнейшей разработки темы автор видит в необходимости проведения регулярного молекулярно-биологического мониторинга циркулирующих на территории РФ возбудителей КТИ, продолжении изучения нейровирулентных и нейроинвазивных свойств сибирского подтипа вируса КЭ, получении и депонировании полноразмерных последовательностей геномов современных штаммов вируса данного подтипа, углубленном изучении причин заболеваемости и летальных исходов среди вакцинированных лиц, изучении генетических маркеров, ассоциированных с развитием, тяжестью течения и исходов заболевания, расширенном изучении этиологической роли *B. miyamotoi*, МЭЧ и ГАЧ в структуре трансмиссивных клещевых инфекций в масштабах страны, разработке ИФА тест-систем для диагностики БМ, создании вакцин против сибирского подтипа возбудителя КЭ и клещевых боррелиозов.

Диссертация Колясниковой Н.М. представляет собой самостоятельно выполненную научно-квалификационную работу, содержит новые научные положения, результаты и решения, имеющие большую теоретическую и практическую значимость. Ее основные результаты опубликованы в 77 научных работах, из них 18 статей – в изданиях из перечня ВАК при Минобрнауке РФ, 7 статей – в журналах, включенных в международные базы (Web of Science, Scopus, PubMed); 12 глав в четырех монографиях (3 – в отечественных и 1 – в зарубежной) и 1 учебное пособие. Основные положения диссертации нашли отражение в опубликованных работах и были

представлены автором на различных научных мероприятиях всероссийского и международного уровней.

Содержание диссертации полностью соответствует научным специальностям 3.2.2. Эпидемиология и 1.5.10. Вирусология.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, отражает основное содержание диссертации и научных публикаций, раскрывает основные положения, выносимые на защиту.

Оформление диссертации и автореферата логично, понятно и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к подготовке данных видов научно-квалификационных работ, незначительные орфографические и стилистические неточности не искажают представление материала.

Комплексная, широкомасштабная диссертационная работа Колясниковой Н.М. вызывает крайне мало вопросов:

1. Насколько эффективен предложенный алгоритм обследования пациентов с подозрением на ГАЧ и МЭЧ и как решить проблемы с их лабораторной диагностикой.

2. Насколько достаточна лабораторная база для дифференциации КБ, вызываемых возбудителями ИКБ и *Borrelia miyamotoi* и включения заболеваний, вызванных последней, в официальную регистрацию.

Поставленные вопросы отражают перспективы дальнейших исследований по направлению работы, не носят принципиального характера и не снижают общей высокой положительной оценки диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Колясниковой Надежды Михайловны на тему «Совершенствование эпидемиологического надзора за клещевым энцефалитом и бактериальными инфекциями, передающимися иксодовыми клещами», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.2.2. Эпидемиология и 1.5.10.

Вирусология, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема эпидемиологии – совершенствование эпидемиологического надзора за клещевым энцефалитом и значимыми для нашей страны бактериальными инфекциями, возбудители которых передаются клещами рода *Ixodes*, имеющая важное народно-хозяйственное значение.

Диссертационная работа Колясниковой Н.М. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями Постановления Правительства РФ № 1539 от 11.09.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.2.2. Эпидемиология и 1.5.10. Вирусология, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России № 662 от 01.07.2015 г.), необходимых для работы диссертационного совета 64.1.010.01.

Официальный оппонент:

Директор ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций»
Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, профессор

Рудаков Н.В.

Подпись Н.В. Рудакова удостоверяю
Ученый секретарь ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций»
Роспотребнадзора, к.м.н.

«

2023 г.

Решетникова Т.А.

Адрес: 644080, г. Омск, проспект Мира, 45, ФБУН Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора. Контактный телефон: (3812) 65-06-33.
Адрес электронной почты: mail@oniipi.org