

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Афиногенова Геннадия Евгеньевича на диссертационную работу Каргальцевой Натальи Михайловны на тему: «Современная культуромика – путь повышения эффективности микробиологической диагностики инфекции кровотока», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология

### Актуальность темы исследования

Выбранная тема диссертантом по актуальности не вызывает сомнений. Инфекция, включая инфекцию кровотока, при соматических заболеваниях становится серьезной проблемой и, к сожалению, не включена в международную классификацию болезней (МКБ-10, МКБ-11). Проблемная ситуация инфекции кровотока заключается в осложнении основного терапевтического заболевания: пневмония, фарингит, целлюлит, заболевания мочевыводящих путей, периодонтит, некротизирующий энтероколит, травма и в генерализации инфекции с длительной персистенцией микроорганизма в кровотоке. В настоящее время растет число эпизодов, которое зависит от географического расположения страны. Уровень летальности при инфекции кровотока может достигать 48% случаев и отличается по видам инфекции кровотока: госпитальной, внегоспитальной и ассоциированной с оказанием медицинской помощи. В блоке интенсивной терапии летальность при инфекции кровотока может достигать 80% случаев.

Верифицируется диагноз инфекции кровотока получением гемокультуры и идентификацией возбудителя. Наблюдаются низкие уровни получения гемокультур в России по приказу МЗ СССР № 535 от 1985 г. и при использовании автоматизированных гемокультуральных систем. По данным зарубежных авторов показана идентичная картина. Отмечают большой разброс в получении гемокультур при использовании ручных методов и автоматизированных методов гемокультивирования.

В России основой питательных сред является панкреатический гидролизат рыбной муки, за рубежом отдельные фирмы используют сердечно-мозговые экстракты для питательных сред при гемокультивировании.

В актуальность разрабатываемой темы в диссертации также входит оценка клинических данных при инфекции в кровотоке у больных терапевтического профиля, отсутствие экспрессных методов диагностики, недостаточные знания принципов культивирования крови, отсутствие унифицированной системы микробиологического исследования крови на вооружении у микробиологов. По этой причине работа, выполненная Каргальцевой Н.М., является актуальной и вовремя. Диссертационная работа представляет собой масштабный многокомпонентный проект в виде разработанной системы микробиологического исследования крови, которая включает классические и экспрессные технологии гемокультивирования, принципы микробиологической культуромики для гемокультивирования, экспрессные методы обнаружения возбудителей в крови микроскопическим и молекулярно-генетическим методами, разработку высокопитательных сред с целью повышения диагностической эффективности при инфекции в кровотоке.

#### **Новизна исследования. Степень обоснования научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Новизна полученных результатов заключается в том, что на основании использования принципов микробиологической культуромики разработана универсальная модель получения гемокультуры и мультифакторная система диагностики инфекции кровотока, включающие микроскопические, бактериологические, молекулярно-генетические, клиничко-лабораторные и анкетированные данные по инфекции кровотока у больных терапевтического профиля, ранее не применяемые в России. На базе комплекса технологических решений расширена информативная этиологическая



структура инфекции кровотока, включая участие не только аэробных, но и анаэробных бактерий и грибов.

Комплексный подход всегда характеризуется системностью в диагностике любого заболевания. Автор показал обоснованные требования к получению гемокультуры, которые предусматривают применение закрытой анаэробной системы, анаэробных газовых условий, сердечно-мозговых питательных сред. Кроме культуральных подходов автор использовал современные масс-спектрометрические и молекулярно-генетические методы для индикации и идентификации микроорганизмов в крови. Из приведенных результатов видно, что клиническо- лабораторные показатели воспаления (симптоматические, гематологические и сывороточные) являются маркерами инфекции кровотока у терапевтических пациентов. Впервые представлена новая методологическая парадигма при диагностике инфекции кровотока, где в качестве материала исследования используют лейкоцитарный слой пробы периферической крови для микроскопического исследования, бактериологической инокуляции на агар в качестве первичного посева и для nested-ПЦР, позволяющей выявлять ДНК микроорганизмов и их Грам-принадлежность. Впервые произведено полногеномное секвенирование штамма микроорганизма, впервые выделенного из крови человека. Эти технические приемы являются существенным достоинством и показателем новизны, что дает возможность внедрить в систему диагностики инфекции кровотока. Другая важная задача перед диссертантом стояла в разработке и апробировании высокопитательной среды, какой является сердечно-мозговая, способная повысить лабораторную диагностику инфекции в кровотоке и стать предметом импортозамещения. На новые разработки получены патенты на изобретение, что подтверждает новизну

Внедрение комплекса интегральной диагностики, состоящего из принципов микробиологической культуромики, разработанной модели получения гемокультуры, лейкоцитарного слоя в исследовании позволили автору обнаружить микроорганизмов в пробах крови в 75,4% случаев микроскопическим методом, получить гемокультуру в 48% случаев. В этиологии определить доминирование грамположительных кокков с ведущим микроорганизмом – *S.epidermidis* у больных терапевтического профиля.

В заключении автор пришел к выводам, что прямая визуализация микроорганизмов в лейкоцитарном слое пробы крови, культивирование на высокопитательных средах, содержащих сердечно-мозговую основу, технологические вариации культивирования повышают уровень верификации клинического диагноза инфекции кровотока

На основании полученных результатов диссертант рекомендует проводить диагностику инфекции кровотока по разработанному алгоритму, соблюдать принципы микробиологической культуромики и систему микробиологического исследования крови, что способствует этиологической диагностике широкого спектра инфекционно-воспалительных заболеваний. Способ использования лейкоцитарного слоя пробы крови для микроскопии, посева и ПЦР служит инструментом мультифакторной диагностики, что отражается на эффективности и относится к экспрессным вариантам в микробиологическом исследовании крови и принципиально отличается от традиционных методов исследования.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Автор показал теоретическую значимость разработанной модели получения гемокультуры, информативной клинико-микробиологической системы исследования крови, альтернативных



способов культивирования микроорганизмов, циркулирующих в кровотоке. Теоретические разработки культивирования крови являются практикоориентированными и откроют потенциалы бактериологических лабораторий в технике выделения возбудителя из крови, расширят знания клиницистов о роли инфекции у больных терапевтического профиля. Разработанная автором система микробиологической диагностики инфекции кровотока, включающая алгоритмы для классического и экспрессного исследования крови, учитывает технические и практические возможности любой лаборатории федерального и регионального уровней, что очень важно для интеграции данных методов на территории всей страны. Автором получены новые данные по этиологии инфекционных осложнений у больных терапевтического профиля, которые получают практическое применение для обоснования эмпирической антимикробной терапии больным инфекцией кровотока. Разработанные автором рецептуры сердечно-мозговых сред расширят перечень отечественных сред и будут способствовать выполнению государственной задачи по импортному замещению зарубежных питательных сред в отечественном практическом здравоохранении. Теоретические разработки и полученные практические результаты Каргальцевой Н.М. имеют задачу оперативного внедрения в микробиологическую практику передовых научных разработок для улучшения практического потенциала в повседневной работе бактериологических лабораторий.

#### **Апробация и достоверность результатов исследования. Публикации в рецензируемых изданиях**

Диссертант использовал классические микробиологические приемы, собственные запатентованные методологические подходы, соответствующие клинико-лабораторные методы исследования и общепринятые статистические техники обработки данных, поэтому достоверность

полученных обширных результатов не вызывает сомнения. Поставленные задачи, цель исследования полноценно нашли отражение в выводах. Результаты, полученные Каргальцевой Н.М., координируют с данными в отечественной и зарубежной литературе, что подтверждает их достоверность. Представленные автором научные положения, выводы, практические рекомендации с высокой степенью достоверности являются следствием полученных результатов исследования.

Результаты диссертационной работы представлены на 14 международных и всероссийских конгрессах и конференциях. По теме диссертации опубликовано 38 научных работ, включая 16 статей в рецензируемых журналах, 4 тезиса в рецензируемых изданиях. Получено 5 патентов на изобретение РФ, подготовлено 5 методических рекомендаций, 2 рационализаторских предложения.

### **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Диссертация написана в традиционном стиле, изложена на 280 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и 2 приложений, которые являются авторскими разработками для сбора информации госпитальных и внегоспитальных пациентов. Диссертация содержит 93 таблицы и иллюстрирована 36 цветными рисунками, включая многофункциональный алгоритм микробиологического исследования крови.

Структура и содержание диссертации, научные положения, выводы, рекомендации в соответствующем объеме изложены в автореферате. Оформление диссертации и автореферата полностью соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ.



Во *Введении* автор внес информацию по актуальности темы исследования, степени разработанности темы, цели работы, задачам исследования, научной новизне, теоретической и практической значимости. В разделе методология и методы исследования автор основательно описал материалы исследования, используемые микробиологические, современные молекулярно-генетические и доказательной медицины методы, количественно показал весь объем исследований. Автор обосновал основные положения, выносимые на защиту, достоверность полученных результатов и личное участие в получении результатов. Автор привел данные по вариантам апробации основных результатов и патентным разработкам.

*Обзор литературы* объемно охватывает доступную информацию по инфекции кровотока с цитированием 373 российских и зарубежных источников в пределах последних лет. В обзоре автор демонстрирует современные точки зрения на все аспекты инфекции кровотока: факторы риска и летальности, эпидемиология проблемы, коморбидность, эмерджентные заболевания, маркеры воспаления, характеристика микробиологической культуромики, современное состояние получения гемокультуры и ее интерпретация, возможности визуализации возбудителя в крови и применяемые молекулярно-генетические и масс-спектрометрические методы. Автор критически анализирует публикуемые данные, тем самым показывая нерешенные проблемы, которые становятся актуальными в данной работе.

В разделе *Результаты собственных исследований* из шести глав включен весь объем проведенных исследований.

В главе 2 «*Современные пути повышения информативности микробиологической диагностики инфекции кровотока*» автор проанализировал процедуру пробоподготовки в процессе получения гемокультуры. Количество проб и объем крови для инокуляции были разные: при классическом методе средняя кратность количества проб на 1 больного

равнялась 2,5 при взятии 10 мл крови, при экспрессном – 1,4 при взятии 4,5 мл крови и было показано, что количество взятия проб крови не влияло на получение гемокультуры. В анаэробных газовых условиях дали рост 42,2% факультативно-анаэробных микроорганизмов, поэтому дополнительно выделили 293 штамма факультативно-анаэробных микроорганизмов, относящихся к ведущим возбудителям инфекции кровотока. Разработанные сердечно-мозговые среды повысили ростовые свойства среды, расширили спектр выделяемых микроорганизмов, а техническое решение среды соответствует критерию «промышленной применимости» и позволит расширить список питательных сред промышленного производства в России. Анализ процесса инкубирования классического посева крови показал, что во флаконах, инкубированных более 7 дней, дополнительно получили 200 гемокультур и выделили 239 клинически значимых штаммов возбудителей. Разработанный метод получения гемокультуры при исследовании лейкоцитарного слоя автор отнес к экспрессному, так как метод сокращает сроки выделения возбудителя и дает возможность использовать MALDI ToF-MS для идентификации выросших колоний на следующий день, т.е. на второй день от момента поступления крови в лабораторию. Индикация микроорганизмов в крови микроскопическим методом при инфекции кровотока в течение 2-х часов позволяет оценить его как экспрессный метод для диагностики инфекции кровотока. Отмечается диагностический результат при обнаружении дрожжевых клеток и нитей псевдомицелия при микроскопии и отсутствие роста грибов в гемокультуре, что является важной клинической информацией для назначения эмпирической терапии. Для индикации и идентификации микроорганизмов в крови автор применил несколько подходов: 16S rRNA типирование, nested-ПЦР для индикации ДНК и для идентификации Грам+ / Грам- микроорганизмов из лейкоцитарного слоя крови. По мнению автора существующие разнообразные подходы оценки клинической значимости гемокультур не являются унифицированными, не затрагивают эпизоды полимикробных инфекций кровотока, не в полной мере



учитывают клинические симптомы инфекции, диагноз и наличие очагов инфекции, поэтому Каргальцева Н.М. разработала и обосновала свои группы значимости: абсолютная и вероятная.

В главе 3 представлены *«Особенности клинико-лабораторного обследования терапевтических больных при инфекции кровотока»* при отдельных терапевтических заболеваниях у госпитальных и внегоспитальных больных. Автор оценил температуру и частоту озноба как скрининговые маркеры при изучении инфекции кровотока и возраст, как фактор риска у лиц пожилого возраста.

В главе 4 *«Верификация инфекции кровотока у терапевтических больных»* автор представил общую микробиологическую картину инфекции кровотока у всех обследуемых терапевтических больных. Видовой состав выделенных возбудителей возглавляли аэробные грамположительные кокки (57,8%) с ведущим видом – *S.epidermidis*. Важным результатом этой главы являются данные о видовом составе и частоте встречаемости ассоциантов в полимикробных гемокультурах (21,8%), частоте возникновения инфекции кровотока при различной соматической патологии. В подобном ракурсе представлены данные отдельно по инфекции кровотока у госпитальных и внегоспитальных больных. Автор получил, что по частоте возникновения инфекции кровотока у госпитальных кардиологических больных картина представлена следующим образом: ревматизм, миокардит и инфекционный эндокардит, а у внегоспитальных: заболевания органов дыхания, мочеполовой системы, после контурной пластики, заболевания полости рта, кожи и подкожной клетчатки, что представляет практические знания для клиницистов.

В главе 5 *«Полногеномное секвенирование штамма Aerococcus spp. ICR-2016»* автор приводит пример идентификации нового микроорганизма и впервые выделенного из крови человека при инфекции кровотока. Генотипические особенности изученного штамма позволили заключить, что

выделенный из крови штамм представляет собой новый вид рода *Aerococcus*. Штамм *Aerococcus* spp. 1КР-2016 был депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

В главе 6 *«Лабораторные маркеры воспаления у терапевтических пациентов и их диагностическое значение при инфекции кровотока»* автор обосновал гематологические показатели и белки «острой фазы» крови в роли лабораторных маркеров инфекции кровотока и оценил клиническую и диагностическую значимость этих показателей крови при разных соматических заболеваниях, что информативно для клиницистов.

Глава 7 *«Интегральные диагностические алгоритмы и система диагностики инфекции кровотока»* посвящена главному вектору диссертационного исследования – созданию системы диагностики инфекции кровотока на основе использования принципов микробиологической культуромики и рычагов выполнения данной системы в виде интегральных диагностических алгоритмов. Система включает классические и альтернативные экспрессные методы микробиологического исследования крови, реально применимые в лабораториях федерального, регионального, территориального уровней, не имеющих современных технических дорогостоящих гемализаторов для получения гемокультуры. Разработанная универсальная система диагностики инфекции кровотока представляет собой комплексный подход к микробиологическому исследованию крови, как самому трудоемкому и важному при жизнеугрожающих заболеваниях.

В разделе *«Заключение»* автор, сопоставляя данные научной литературы и полученные результаты, дал оценку теоретическим знаниям и практической значимости работы. Каргальцева Н.М. обосновала собственные результаты и постулаты по гемокультивированию и интерпретации полученных результатов. В диссертации представлено 6 **выводов**, полностью



соответствующих поставленной цели и задачам, используя принципы доказательной медицины.

В разделе «*Практические рекомендации*» представлено 8 предложений, которые могут быть интересны и важны для программных документов и циклов повышения квалификации медицинских микробиологов и клиницистов любого профиля. В перспективе диссертационные разработки могут быть включены в практическую работу бактериологических лабораторий любого уровня.

Таким образом, диссертационная работа Каргальцевой Натальи Михайловны может быть квалифицирована как завершённое исследование, которое по научно-практической значимости, объёму исследований, новизне и ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационного исследования.

#### **Соответствие специальности**

Изложенные в диссертационной работе Каргальцевой Н.М. задачи, методы исследования, научные положения и выводы соответствуют паспорту специальности 1.5.11.– микробиология (медицинские науки) и области исследования, пункты: 1 – «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 2 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 3 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне». Принципиальных замечаний по диссертации нет.

При анализе диссертации у меня возникло несколько вопросов:

1. При диагностике инфекции кровотока госпитальных и внегоспитальных больных можете ли вы обозначить схожие черты и принципиальные различия между этими группами больных по полученным результатам?

2. При микроскопии мазка крови в 66,9% обнаруживали бактериально-грибковые ассоциации, чаще стафилококк с грибами р.Candida. Можно ли объяснить патогенетическую связь между этими микроорганизмами, этого симбиоза?

3. При классическом методе посева 10 мл крови в сердечно-мозговую среду, соотношении 1:20, в анаэробных условиях получали гемокультуру в 38,3%, а экспрессный метод посева лейкоцитарного слоя из 4,5 мл крови с культивированием тоже в анаэробных условиях дал 48,0% положительных гемокультур? Что является причиной такой разницы?

### **Заключение**

Диссертационная работа Каргальцевой Натальи Михайловны на тему: «Современная культуромика – путь повышения эффективности микробиологической диагностики инфекции кровотока», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология, является законченным научно-квалифицированным трудом, в котором на основании обстоятельных исследований, выполненных автором, предпринята попытка показать и реально решить важную практическую проблему в медицинской микробиологии – разработку системы микробиологического исследования крови и применение алгоритмов системы для диагностики инфекции кровотока при терапевтической патологии.

Диссертационная работа Каргальцевой Натальи Михайловны «Современная культуромика – путь повышения эффективности микробиологической диагностики инфекции кровотока», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых



степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016, №650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, № 751 от 26.05.2020, № 426 от 20.03.2021, № 1539 от 11.09.2021 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор, Каргальцева Наталья Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

### Официальный оппонент

Профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии факультета стоматологии и медицинских технологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (ФГБОУ ВО СПбГУ)

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9.

Тел: +7 (812) 328 2000

Эл.почта: [spbu@spbu.ru](mailto:spbu@spbu.ru)

доктор медицинских наук,

профессор

08.09.2022



Афиногенов Геннадий Евгеньевич

Подпись профессора кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии факультета стоматологии и медицинских технологий, доктора медицинских наук Афиногенова Геннадия Евгеньевича заверяю:

*Заместитель начальника Управления кадров*

Краснова Е.П.

Ученый секретарь факультета стоматологии и медицинских технологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

доктор медицинских наук

Дмитрий Юрьевич Мадай

Подпись руки	<i>Мадай Д.Ю. Юрьевич</i>
<b>УДОСТОВЕРЯЮ</b>	
Будущий специалист по-кадрам	<i>Зам. нач. Управления кадров</i>
«08» 09	2022



Краснова Е.П.