

ОТЗЫВ

Официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Чеботкевича Виталия Николаевича 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 1.55.11 - микробиология

Актуальность темы исследования

Тема, выбранная диссертантом, является актуальной без всякого сомнения. В настоящее время растет число эпизодов инфекций при терапевтических заболеваниях, включая инфекцию кровотока, и эта ситуация является проблемой, так как потенциально инфекция может осложнять любое терапевтическое заболевание: пневмония, фарингит, целлюлит, заболевания мочевыводящих путей, периодонтит, некротизирующий энтероколит, травма и перейти в стадию генерализации с длительной персистенцией микроорганизма в кровотоке. Уровень летальности при инфекции кровотока в некоторых странах достигает 48% случаев, отличается также по месту возникновения: в госпитале, вне госпиталя или при оказании медицинской помощи, но самые высокие уровни летальности отмечают в блоке интенсивной терапии (80%).

Подтверждают диагноз инфекции кровотока по результатам получения гемокультуры и выделению микроорганизма из крови. В России микробиологическое исследование крови большинство лабораторий проводят согласно приказу МЗ СССР № 535 от 1985 г, который был отменен в 2020 году (приказ № 889 от 24.08.2022 года) и некоторые лаборатории имеют возможность использовать автоматизированные гемокультуральные системы. Отмечается низкий средний показатель получения гемокультур при использовании ручных и автоматизированных методов гемокультивирования в нашей стране и за рубежом. При микробиологическом исследовании крови в России применяют питательные среды, основой которых является

панкреатический гидролизат рыбной муки, а сердечно-мозговые экстракты добавляют в некоторые зарубежные среды. Диссертационная работа охватывает несколько аспектов при обследовании больных с подозрением на инфекцию кровотока. Автор взвешивает важность клинических и анамнестических данных терапевтических пациентов. Автор проводит апробирование новых разработанных технологий получения гемокультуры и экспрессной индикации микроорганизмов в крови путем микроскопического исследования мазка крови, которые до настоящего времени не применялись в России в силу недостаточных знаний по диагностике и культивированию микроорганизмов в искусственных условиях роста, отсутствия унифицированной системы микробиологического исследования крови. Работа, выполненная Каргальцевой Н.М., является актуальной и современной. Автор представил крупномасштабное исследование, основу которого составляет лично разработанная система микробиологического исследования крови, включающая классические и экспрессные методы гемокультивирования, экспрессные методы обнаружения возбудителей в крови микроскопическим и молекулярно-генетическим методами, разработку высокопитательных сред и принципы микробиологической культуромики с целью повышения диагностической эффективности инфекции в кровотоке.

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

Новизна диссертационного исследования содержится в современном решении использовать условия микробиологической культуромики с целью повышения эффективности выделения микроорганизмов из крови и заложить их в основу универсальной модели получения гемокультуры и, как результат основной задачи, заложить фундамент микробиологического исследования крови в виде научно-практической системы. С этой целью автор включил многокомпонентный подход с использованием различных методов: микроскопический, культуральный, молекулярно-генетический, клинко-лабораторный и сбор анкетных данных при инфекции кровотока у больных

терапевтического профиля, что относится к новизне в микробиологической практике. Такой подход позволил получить широкий спектр возбудителей инфекции кровотока, включая факультативно-анаэробных и строго анаэробных бактерий и грибов. Обоснованию научных положений, выводов и рекомендаций способствовал примененный комплексный подход и полученные результаты утилизации разработанной системы микробиологического исследования крови, которая представляла логический процесс с выполнением обязательных условий гемокультивирования крови на каждом этапе цикла. Система всегда дает результаты. Каргальцева Н.М. доказала обязательное применение закрытой анаэробной системы, анаэробных газовых условий, сердечно-мозговых питательных сред на протяжении всего процесса гемокультивирования. Автор применил современные масс-спектрометрические и молекулярно-генетические методы для индикации и идентификации микроорганизмов в крови. Общепринятые клинико-лабораторные показатели воспаления (симптоматические, гематологические и сывороточные), предсказывающие прогноз и исход заболевания, оказались полезными маркерами инфекции кровотока у терапевтических пациентов. Автор представил новый вектор в микробиологическом исследовании крови, используя лейкоцитарный слой пробы периферической крови для микроскопического исследования, бактериологической инокуляции на агар в качестве первичного посева, для nested-ПЦР, позволяющей выявлять ДНК микроорганизмов и их Грам-принадлежность. Использование данного метода позволило впервые выделить из крови человека штамм микроорганизма нового вида рода *Aerococcus* и провести полногеномное секвенирование для идентификации, что несомненно является показателем новизны. Питательная среда является главным направлением в развитии медицинской микробиологии, поэтому разработка рецептуры и апробация сердечно-мозговых сред (жидкой и агаровой) служит фактором повышения эффективности выделения возбудителей из крови и является предметом импортозамещения.

Полученные патенты на технические решения микробиологического исследования крови и питательные среды являются лучшим доказательством новизны всех проведенных разработок. Все новые разработки были ориентированы на практическое использование. Применение комплексной интегральной диагностики, принципов микробиологической культуромики, разработанной модели получения гемокультуры, получение и использование лейкоцитарного слоя в исследовании сделали возможным выявить в 75,4% случаев микроорганизмы в крови микроскопическим методом, получить гемокультуру в 48% случаев, определить преобладание в этиологии инфекции кровотока грамположительных кокков с ведущим микроорганизмом – *S.epidermidis* у больных терапевтического профиля. В заключении автор обосновал те механизмы, которые повышают диагностику инфекции кровотока при терапевтической патологии, а именно: технологические вариации культивирования крови на высокопитательной среде и при анаэробных условиях, микроскопию мазка крови, молекулярно-генетические методы. Разработанная система содержит свои рычаги в виде разработанных алгоритмов на классический и альтернативный методы культивирования крови, микроскопию мазков крови и молекулярно-генетические методы. Соблюдение предложенных алгоритмов исследования расширит этиологическую характеристику возбудителей и повысит диагностическую эффективность инфекции кровотока. Применение микроскопического метода для визуализации микроорганизмов в крови, альтернативного метода культивирования крови и nested-ПЦР на основе одного материала – лейкоцитарного слоя пробы крови можно рассматривать как мультифакторная диагностика инфекции кровотока в купе с экспрессными техниками диагностики, что существенно отличает от традиционных методов исследования.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Разработанные микробиологическая система исследования крови и модель получения гемокультуры, клинико-лабораторный подход к диагностике инфекции кровотока, альтернативная модель культивирования крови показаны как достойная теоретическая платформа для внедрения в микробиологическую практику. Практическое внедрение теоретических разработок повысят знания о значении инфекции при терапевтических заболеваниях у медицинских микробиологов и врачей клинического профиля. Предложенные алгоритмы комплексной системы исследования крови предлагают к применению классический и экспрессный методы посева крови, дополнительные методы диагностики: микроскопию мазка, молекулярно-генетические. Автор разработал систему диагностики инфекции кровотока таким образом, чтобы она была практически реализована любой лабораторией федерального и регионального уровней, что необходимо для интеграции системы на территории всей страны. Благодаря разработанной системе микробиологического исследования крови, использованию принципов микробиологической культуромики, технического способа получения лейкоцитарного слоя из пробы крови представлена масштабная этиологическая видовая картина возбудителей инфекции кровотока у терапевтических больных, что показано впервые в России. На основании теоретической информации имеется возможность для клиницистов разработать схемы эмпирического антимикробного лечения для больных. Сердечно-мозговые среды являются основополагающими при гемокультивировании. Теоретически разработанные рецептуры и практически апробированные на материале от больных дают большой шанс на промышленное производство по импортному замещению зарубежных питательных сред в отечественном практическом здравоохранении.

Таким образом, Каргальцева Н.М. теоретически разработала технические варианты гемокультивирования, визуализацию микроорганизмов в крови экспрессным методом, метод ПЦР для индикации и идентификации микроорганизмов в лейкоцитарном слое пробы крови и на полученных

результатах показала их практическое применение. Этот факт важен для улучшения практического потенциала в повседневной работе бактериологических лабораторий.

Апробация и достоверность результатов исследования. Публикации в рецензируемых изданиях

Масштабность результатов, полученных Каргальцевой Н.М., благодаря использованию широкого набора методик: классический посев крови, запатентованный альтернативный метод посева крови, микроскопическое исследование крови, молекулярно-генетический и масс-спектрометрический методы, применение косвенных диагностических приемов – клинико-лабораторные показатели крови (гематологические и сывороточные) и поэтому достоверность результатов не вызывает сомнения. Поставленные задачи, цель исследования отражены в выводах. Результаты, полученные автором, перекликаются с опубликованными данными в отечественной и зарубежной печати, что тоже подтверждает их достоверность. Представленные автором научные положения, выводы, практические рекомендации с высокой степенью достоверности являются результатом полученных исследований.

Результаты диссертационной работы автор представила 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

Каргальцева Н.М. изложила диссертационное исследование на 280 страницах машинописного текста в традиционном стиле и оно состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы

дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и двух приложений в виде анкет отдельно для госпитальных и внегоспитальных больных. Диссертация иллюстрирована 93 таблицами и 36 цветными рисунками, отдельно представлен алгоритм микробиологического исследования крови.

Содержание диссертации, научные положения, выводы, рекомендации изложены в автореферате. Оформление диссертации и автореферата полностью соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ.

Введение

Автор показал актуальность выбранной темы для исследования, степень разработанности в России и за рубежом, цель работы, задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость темы исследования. В разделе методология автор изложил материалы исследования: пациенты, штаммы микроорганизмов, биологический материал в виде проб цельной крови и лейкоцитарного слоя пробы периферической крови. В методах исследования Каргальцева Н.М. представила микроскопические, бактериологические, молекулярно-генетические, клиничко-лабораторные, доказательной медицины и статистические методы, использованные в исследовании. Полный объем исследований представлен в таблице. Автор обосновал основные положения, выносимые на защиту, достоверность полученных результатов и личное участие в получении результатов. Автор дал характеристику результатам по апробации разработанных технологий и патентов.

Обзор литературы

Каргальцева Н.М. разносторонне представила доступные в печати отечественные и зарубежные данные по инфекции кровотока. Автор показал проблемы инфекции кровотока у терапевтических больных и связанные с ними факторы риска возникновения и летальности. Автор разбирает вопросы эпидемиологии, коморбидные и эмерджентные

заболевания, сопутствующие данной патологии, маркеры воспаления, определение и суть микробиологической культуромики. Автор анализирует разные подходы к проблеме получения гемокультуры и ее интерпретации, обнаружение микроорганизмов микроскопическим методом, современные молекулярно-генетические методы, применяемы в мировом микробиологическом сообществе. Несмотря на решение некоторых проблем в публикациях автор замечает нерешенные проблемы, которые ставит задачами в данной работе.

Раздел *Результаты собственных исследований* состоит из шести глав.

Глава 2 «Современные пути повышения информативности микробиологической диагностики инфекции кровотока»

Глава начитается с процесса пробоподготовки для гемокультивирования. Для классического метода автор отбирал 10 мл крови и в общем исследовании приходилось 2,5 пробы на одного больного. При альтернативном экспрессном варианте гемокультивирования отбирал 4,5 мл крови для получения лейкоцитарного слоя из данной пробы крови и на одного пациента использовали 1,4 пробы крови для получения гемокультуры. При сравнении результатов получения гемокультуры оказалось, что количество взятия проб крови не влияло на получение гемокультуры. Далее автор показал целесообразность использование анаэробных газовых условий на всем протяжении гемокультивирования. Факультативно-анаэробные микроорганизмы, ведущие возбудители инфекции кровотока, дали рост в анаэробных условиях в 4,2% случаев, поэтому получили дополнительно к аэробным условиям 293 штамма микроорганизмов. Каргальцева Н.М. разработала рецептуры сердечно-мозговых сред (жидкой и агаровой) и апробировала их ростовые свойства. Кроме того, что эти среды показали эффективность выделения микроорганизмов из крови и расширили этиологию возбудителей, они соответствовали критерию «промышленной применимости», появилась

возможность промышленного производства в России и решение вопроса импортозамещения. Известно, что при ручном методе инкубируют посев крови 7 дней и при автоматизированном – 5 дней. Автор экспериментально показал эффективность инкубирования более 7 дней флаконов с инокулированной кровью и дополнительно получил 200 гемокультур и выделил 239 клинически значимых штаммов возбудителей. Автором был предложен альтернативный метод получения гемокультуры при помощи посева лейкоцитарного слоя пробы периферической крови. Данный метод Каргальцева Н.М. расценила как экспрессный, так как это техническое решение сокращает сроки выделения возбудителя и дает возможность использовать MALDI ToF-MS для идентификации выросших колоний на второй день от момента поступления крови в лабораторию. Для диагностики жизнеугрожающих ситуаций при инфекции кровотока важно экстренно определить морфологию и Грам-принадлежность циркулирующих в кровотоке микроорганизмов. С этой целью Каргальцева Н.М. демонстрирует эффективность такого обнаружения возбудителей через 2 часа с момента поступления пробы в лабораторию путем микроскопии лейкоцитарного слоя пробы крови, который можно признать как экспрессный метод диагностики инфекции кровотока. Достоинство данного метода заключается и в том тоже, что возможно увидеть дрожжевые клетки, нити псевдомицелия и мицелия при отсутствие роста грибов в гемокультуре. Эта информация крайне важна клиницистам для назначения адекватной эмпирической терапии. Для индикации и идентификации микроорганизмов в крови автор применил молекулярно-генетические методы: nested-ПЦР для индикации ДНК и для идентификации Грам-принадлежности микроорганизмов в лейкоцитарном слое крови. Каргальцева Н.М. обосновала свои группы: абсолютная и вероятная для оценки клинической значимости полученных гемокультур и возбудителей из них.

Глава 3 «Особенности клинико-лабораторного обследования терапевтических больных при инфекции кровотока»

В данной главе автор показал особенности повышенной температуры тела, озноба, возрастные характеристики и гендерные показатели терапевтических больных инфекцией кровотока

Глава 4 «Верификация инфекции кровотока у терапевтических больных»

В этой главе автор описывает результаты микробиологического исследования крови у всех обследуемых терапевтических больных и отдельно у госпитальных и внегоспитальных пациентов. В таблицах отражен видовой спектр выделенных микроорганизмов у всех и отдельно для госпитальных и внегоспитальных больных. Характерной особенностью в этиологии инфекции кровотока при терапевтической патологии является преобладание аэробных грамположительных кокков (57,7%), внутри этой группы лидирует *S.epidermidis*. Автор подробно описал 21,8% случаев полимикробных гемокультур: частоту выделения, количественную и качественную характеристики ассоциантов, видовой состав ассоциантов. Важным моментом для клинических врачей является демонстрация частоты эпизодов инфекции кровотока у госпитальных кардиологических больных: ревматизм, миокардит и инфекционный эндокардит. Также представлены заболевания у внегоспитальных пациентов с наибольшей частотой возникновения эпизодов инфекции кровотока: заболевания органов дыхания, мочеполовой системы, после контурной пластики, заболевания полости рта, кожи и подкожной клетчатки

Глава 5 «Полногеномное секвенирование штамма *Aerococcus* spp. 1KP-2016»

Каргальцева Н.М. приводит вариант идентификации нового микроорганизма, впервые выделенного из крови человека при инфекции кровотока согласно его генотипическим особенностям. Это – новый вид рода *Aerococcus* – *Aerococcus* spp. 1KP-2016, который был депонирован в

Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

Глава 6 «Лабораторные маркеры воспаления у терапевтических пациентов и их диагностическое значение при инфекции кровотока»

Автор анализировал гематологические показатели и белки «острой фазы» крови и обосновал их диагностическую роль при инфекции кровотока при соматических заболеваниях.

Глава 7 «Интегральные диагностические алгоритмы и система диагностики инфекции кровотока»

Автор в этой главе показал многогранность использования предложенных диагностических интегральных алгоритмов, применение их указывает на то, что при микробиологическом исследовании крови микробиологи придерживаются разработанной системы получения гемокультуры, принципов микробиологической культуромики и экспрессных методов диагностики. Система микробиологического исследования крови представляет масштабный многокомпонентный проект диагностики, включающий классические и альтернативные методы бактериологического исследования крови, экспрессные методы получения гемокультуры и диагностики инфекции кровотока и по своей практикоориентированности применимы в лабораториях федерального, регионального, территориального уровней, не имеющих современных технических дорогостоящих автоматизированных геманализаторов для получения гемокультуры. Разработанная система микробиологического исследования крови – это универсальная диагностика инфекции кровотока при любой патологии.

«Заключение»

Каргальцева Н.М. сформулировала сопоставление полученных собственных результатов с данными научной литературы и дала оценку преимуществу разработанных технических методов по полученным результатам. Автор обосновал собственную разработку по получению

гемокультуры, клинико-диагностическую ее интерпретацию. Полученные результаты Каргальцева Н.М. отобразила в 6 **выводах**, полностью соответствующих поставленной цели и задачам.

«Практические рекомендации»

Каргальцева Н.М. вывела 8 предложений для включения их в методические рекомендации, в программу для повышения квалификации медицинских микробиологов и клиницистов, в практические документы бактериологических лабораторий любого уровня.

Таким образом, диссертационная работа Каргальцевой Натальи Михайловны может быть квалифицирована как завершенное исследование, которое по научной, теоретической и практической значимости, объему 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. Разработанный nested-ПЦР на основе лейкоцитарного слоя для индикации и идентификации по Грам-принадлежности имеет ли какие преимущества по

отношению к обнаружению микроорганизмов методом ПЦР из положительной гемокультуры?

2. По обнаруженным при микроскопии клеткам грибов р.Candida и нитям псевдомицелия можно ли судить о прогнозе, утяжелении инфекции кровотока и на каком основании?

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 решить важную практическую задачу 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

Руководитель лаборатории бактериологии Федерального государственного
бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического
агентства» России, доктор медицинских наук, профессор (ФГБУ РосНИИГТ
МБА России)

Адрес: Санкт-Петербург, 191024, ул. 2-я Советская, д.16

Тел.: +7 (812) 274-5650

Эл.почта: bloodscience@mail.ru сайт: www.bloodscience.ru

доктор медицинских наук,

профессор

09.08.2022

Чеботкевич Виталий Николаевич

Подпись руководителя лаборатории бактериологии Федерального
государственного бюджетного учреждения «Российский научно-
исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального
медико-биологического агентства» России, доктор медицинских наук,
опрофессора Чеботкевича Виталия Николаевича заверяю:

врио Ученого секретаря ФГБУ «Российский научно-исследовательский
институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-
биологического агентства» России



Жигулева Любовь Юрьевна