

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Кветной Аси Степановны 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

Представленная к защите в Ученый совет при ФБУН «Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора диссертация Каргальцевой Натальи Михайловны на тему: «Современная культуромика – путь повышения эффективности микробиологической диагностики инфекции кровотока», на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология, выполненная в ФБУН «Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, посвящена актуальной проблеме здравоохранения, что обусловлено частотой регистрации инфекционных осложнений в виде «инфекции кровотока», как при соматической, так и инфекционной патологии. Инфекция кровотока способна осложнять любое терапевтическое заболевание: пневмонию, фарингит, целлюлит, заболевания мочеполовых путей, периодонтит и перейти в генерализованную форму с длительной циркуляцией микроорганизма в кровотоке. В последние годы во всем мире, как и в России, отмечается рост числа эпизодов инфекции кровотока. Эти показатели разнятся по географическому расположению страны в мире и по эпидемиологическому характеру самой инфекции кровотока: госпитальная, внегоспитальная и связанная с оказанием медицинской помощи.

Диагноз инфекции кровотока ставят только по факту получения гемокультуры, идентификации выделенного возбудителя и определения резистентности выделенного микроорганизма к антимикробным препаратам.

Средний результат получения гемокультур в России составляет 13,4%-20% случаев, за рубежом - от 3% до 43,7%. В России большинство бактериологических лабораторий работают в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535 от 1985 г., несмотря на то, что он уже отменен (по приказу № 889 от 24.08.2020 г.). Кроме того, широко используемый панкреатический гидролизат рыбной муки служит питательной основой для большинства микробиологических сред в России. Некоторые зарубежные фирмы применяют сердечно-мозговые экстракты для гемокультивирования, однако сведения об эффективности их практически отсутствуют.

Таким образом, низкая эффективность получения гемокультур и диагностики инфекции кровотока связана с низким уровнем знаний по гемокультивированию и отсутствием системы клинико-микробиологического исследования крови, основанной на принципах микробиологической культуромики. Исходя из вышеизложенного, диссертант поставила следующую цель работы - на основе инновационных принципов микробиологической культуромики разработать современную модель исследования гемокультуры с целью повышения информативности клинико-микробиологической диагностики инфекций кровотока у пациентов с терапевтическими заболеваниями. Основная цель выполненного исследования прослеживается во всех разделах собственных исследований.

Степень новизны исследования и обоснования научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Научная новизна диссертационной работы Каргальцевой Н.М. основана на научном фундаменте, ядром которого являются инновационные принципы микробиологической культуромики, универсальная модель получения гемокультуры, информативная микробиологическая диагностика инфекции кровотока. Для разработки системы микробиологического исследования крови необходим комплекс, который состоит из микроскопических, культуральных, молекулярно-генетических, клинико-лабораторных методов

исследования крови для получения полной диагностической картины инфекции кровотока у больных терапевтического профиля. Комплексный диагностический подход расширит информацию об этиологии инфекции кровотока у пациентов с соматическими заболеваниями. Многокомпонентный подход к задаче получения гемокультуры охватывает внедрение в микробиологическую практику закрытой анаэробной системы, анаэробных газовых условий, сердечно-мозговых питательных сред, масс-спектрометрических и молекулярно-генетических методов для индикации и идентификации микроорганизмов в крови. Автор показал, что симптомы воспаления (клинические, гематологические и сывороточные показатели крови) при терапевтической патологии являются маркерами инфекции, конкретно, инфекции кровотока. Каргальцева Н.М. разработала новый вектор в процессе получения гемокультуры и диагностики инфекции кровотока, который заключался в использовании в качестве исследуемого материала лейкоцитарный слой пробы периферической крови, который можно рассматривать как передовую научную разработку при гемокультивировании. Данный материал подходит для микроскопического исследования крови и для nested-ПЦР, позволяющей выявлять ДНК микроорганизмов и их Грам-принадлежность. Применение полногеномного секвенирования штамма нового вида микроорганизма, впервые выделенного из крови, является доказательством не только новизны, но и достоинством разработанного исследования. Эти данные обоснованно подтверждают технологическую новизну в микробиологическом исследовании крови и необходимость практического внедрения в учреждения страны. Автор разработал рецептуры сердечно-мозговых сред (жидкая для флаконов и агаровая), апробировал эти среды, показал их питательное преимущество и возможность промышленного производства в целях импортозамещения, что актуально в настоящее время. Автором получены патенты на методические разработки и на среды, что подтверждает новизну диссертационной работы. Полученные автором результаты показали этиологическую структуру

осложнений при терапевтической патологии, в которой характерной чертой, что отличает от хирургических осложнений, является грамположительная флора с ведущим микроорганизмом – *S.epidermidis*. Автор пришла к выводу, что решение в наукоемком разделе медицинской микробиологии, к которому относится микробиологическое исследование крови, необходимо работу выполнять согласно принципам системы исследования крови, соблюдая условия микробиологической культуромики, используя альтернативные методы гемокультивирования, микроскопическое исследование крови, высокопитательные среды, к которым относятся сердечно-мозговые.

На основании полученных данных Каргальцева Н.М. рекомендует при диагностике инфекции кровотока использовать разработанные алгоритмы системы микробиологического исследования крови. Для повышения качества эффективности диагностики применять экспрессные методы визуализации возбудителей в крови и выделения их из крови, использовать технический прием получения лейкоцитарного слоя пробы крови для микроскопического, культурального и молекулярно-генетического видов исследования.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы.

Теоретические разработки Каргальцевой Н.М. ориентированы на практическую работу медицинских микробиологов. Автором показана теоретическая обоснованность применения принципов микробиологической культуромики, включающие анаэробные условия культивирования крови, высокопитательные среды, экспрессные методы обнаружения и выделения возбудителей из крови и на полученных результатах отражена практическая достоверность этих передовых научных разработок. Полученные теоретические знания о роли инфекции при соматических заболеваниях, этиологическая масштабность выделенных возбудителей инфекции кровотока, выявление ведущей в этиологии грамположительной флоры позволяет клиницистам практически обосновать подбор адекватной антимикробной терапии на ранней стадии инфекционного процесса и снизить

летальность при инфекции кровотока у терапевтических больных. Разработанная Каргальцевой Н.М. система микробиологического исследования крови и алгоритмы для классического и экспрессного изучения крови, учитывает технические и практические условия лабораторий федерального или регионального уровней, поэтому важна интеграция разработанных методов в лечебно-профилактических организациях любого уровня. Разработанные автором рецептуры жидкой и плотной сердечно-мозговых сред являются вкладом в перечень выпускаемых отечественных сред, открывают возможность по импортному замещению зарубежных питательных сред в промышленном масштабе. Теоретические разработки по микробиологической диагностике инфекции кровотока Каргальцевой Н.М. имеют научный фундамент для повышения качества и доступности исследования крови в практической работе медицинских микробиологов.

Апробация и достоверность результатов исследования. Публикации в рецензируемых изданиях. Достоверность результатов диссертационного исследования Каргальцевой Н.М. подкрепляется обширным объемом исследований, применением классических методов, экспрессных технических решений, получивших патенты на изобретение, общепринятых статистических приемов анализа и сертифицированного оборудования. Разработанные методологические приемы были апробированы и показали результаты, подтверждающие их эффективность и взаимосвязаны с данными отечественной и зарубежной литературы. Поставленные задачи, цель исследования полноценно нашли отражение в выводах. Представленные автором научные положения, выводы, практические рекомендации достоверны, обоснованы и являются следствием полученных результатов исследования.

Результаты диссертационной работы отображены в 14 международных и всероссийских конгрессах и конференциях. По теме диссертации опубликовано 38 научных работ, включая 16 статей в рецензируемых

журналах, рекомендованных ВАК. Получено 5 патентов на изобретение РФ, подготовлено 5 методических рекомендаций, 2 рационализаторских предложения.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа изложена в традиционном стиле на 280 страницах машинописного текста и 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 представляют собой разработанные анкеты-опросники для сбора информации о госпитальных и внегоспитальных пациентах. 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.

Введение. В этом разделе обсуждаются вопросы актуальности и степени разработанности темы исследования, цели и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость представленной диссертации. В разделе методология и методы исследования автор показал материалы исследования, методы: микробиологические, молекулярно-генетические и доказательной медицины. В таблице показан полный объем выполненных исследований. Автор аргументировал основные положения, выносимые на защиту, достоверность полученных результатов и личное участие в получении результатов, привел результаты апробации патентных разработок.

Обзор литературы. Автор использовал 373 российских и зарубежных источников в пределах последних лет. С научным подходом автор

анализировал: современные отечественные и зарубежные методы гемокультивирования, особенности инфекции кровотока, эпидемиологические черты эпизодов инфекции кровотока по разным географиям стран, повторность инфекции кровотока, влияние коморбидности на прогноз и летальность, возвращение эмерджентных заболеваний на примере грибов *p.Candida*, роль показателей воспаления при инфекции кровотока, интерпретацию полученных гемокультур и выделенных микроорганизмов из крови. Широко представлены применяемые в мире современные молекулярно-генетические и масс-спектрометрические методы. Критический анализ на процесс диагностики инфекции кровотока показал нерешенные вопросы по данной теме в мировом сообществе.

«Современные пути повышения информативности микробиологической диагностики инфекции кровотока» (глава 2). Автор в этой главе показал все разработки по ходу цепочки гемокультивирования: преаналитический, аналитический и постаналитический этапы. Сравнение количества проб на одного больного и объема инокулированной крови классического и разработанного экспрессного метода показало количественное превосходство последнего (1,4 пробы и 4,5 мл крови) над классическим (2,5 пробы и 10 мл крови). Полученные результаты подтвердили мнение автора, что количество проб крови не влияет на результат получения гемокультуры. Видные зарубежные специалисты сомневаются в целесообразности применения анаэробных условий для гемокультивирования. Автору удалось обосновать эффективность и важность анаэробных условий на выделении 293 штаммов ведущих возбудителей инфекции кровотока из числа факультативно-анаэробных микроорганизмов, что составляло 42,2% случаев. Техническое решение разработанной автором сердечно-мозговой среды соответствует критерию «промышленной применимости», что позволяет увеличить список выпускаемых промышленных питательных сред в России. Известно, что установлены режимы инкубирования крови при ручном (7 дней) и автоматизированном (5 дней) методах гемокультивирования. Автор

инкубировал флаконы с инокулированной кровью дольше, чем 7 дней, и дополнительно получил 200 гемокультур и 239 клинически значимых штаммов возбудителей. Разработанный альтернативный метод получения гемокультуры заключался в получении лейкоцитарного слоя из пробы крови и использовании его в качестве посевного материала. Автор придал методу статус экспрессного, так как метод сокращал сроки выделения возбудителя и давал возможность использовать MALDI ToF-MS для идентификации выросших колоний на следующий день, то есть, на второй день от момента поступления крови в лабораторию. Микроскопическое исследование мазка крови для экспрессного обнаружения циркулирующих микроорганизмов в кровотоке позволяло в течение 2-х часов дать ориентировочный ответ по инфекции в крови, обнаружить дрожжевые клетки и нити псевдомицелия при отсутствии их роста в гемокультуре, что являлось важной информацией для назначения клиницистом эмпирической терапии. Для обнаружения и выделения микроорганизмов из крови автор применил несколько подходов из молекулярно-генетических методов: 16S rRNA типирование, nested-ПЦР для индикации ДНК и для идентификации Грам+ / Грам- микроорганизмов в лейкоцитарном слое пробы крови. Для оценки клинической значимости полученных результатов гемокультивирования Каргальцева Н.М. разработала и обосновала свои группы значимости: абсолютная и вероятная.

«Особенности клинико-лабораторного обследования терапевтических больных при инфекции кровотока» (глава 3). Автор привел характерные клинические симптомы для инфекции кровотока, отметил более выраженную частоту озноба, чем повышенная температура тела, оценил возраст больного как фактор риска возникновения инфекции кровотока.

«Верификация инфекции кровотока у терапевтических больных» (глава 4). В этой главе автор показал общую этиологическую картину инфекции кровотока у всех обследуемых терапевтических больных. Ведущими возбудителями были аэробные грамположительные кокки

(57,8%), в которых доминирующим был *S.epidermidis*. Автор подробно изучил полимикробные гемокультуры (21,8%) при терапевтической патологии, включая видовой этиологический состав, особенности ассоциаций. Подобным образом автором исследованы эпизоды инфекции кровотока у госпитальных кардиологических и внегоспитальных с разными диагнозами больных, включая полимикробные гемокультуры в этих группах.

У кардиологических пациентов частота развития инфекции кровотока распределялась следующим образом: ревматизм, миокардит и инфекционный эндокардит, у внегоспитальных – заболевания органов дыхания, мочеполовой системы, после контурной пластики, заболевания полости рта, кожи и подкожной клетчатки. Полученные данные представляют научный и практический интерес для отечественного здравоохранения.

«Полногеномное секвенирование штамма *Aerococcus spp.* 1KP-2016» (глава 5). Было проведено полногеномное секвенирование для идентификации нового микроорганизма и впервые выделенного из крови человека при инфекции кровотока. Новый вид рода *Aerococcus spp.* 1KP-2016 был депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

«Лабораторные маркеры воспаления у терапевтических пациентов и их диагностическое значение при инфекции кровотока» (глава 6). Автор изучил гематологические показатели и белки «острой фазы» крови и обозначил их в роли лабораторных маркеров инфекции кровотока. Клиническая и диагностическая значимость этих показателей крови важна для клиницистов при разных соматических заболеваниях.

«Интегральные диагностические алгоритмы и система диагностики инфекции кровотока» (глава 7). В данной главе автор показывает разные алгоритмы микробиологического исследования крови, как основополагающие механизмы системы диагностики инфекции кровотока,

разработанные на основе использования принципов микробиологической культуромики. Система включает классические и альтернативные экспрессные методы микробиологического исследования крови. Многовекторные алгоритмы позволяют исследовать кровь при подозрении инфекции в кровотоке лабораториям федерального, регионального, территориального уровней, не имеющих автоматизированных геманализаторов. Разработанная система диагностики инфекции кровотока – это комплексный подход к микробиологическому исследованию крови, как самому трудоемкому и важному при жизнеугрожающих состояниях.

Заключение

Каргальцева Н.М. полученные собственные результаты соотносила с опубликованными данными научной литературы, взвешивала достоинства и недостатки сравниваемой информации, определяла достоинства теоретических знаний для оперативного внедрения в микробиологическую практику. Каргальцева Н.М. обосновала собственные результаты и суждения по гемокультивированию и интерпретации полученных результатов. В диссертации представлено 6 выводов, полностью соответствующих поставленной цели и задачам, используя принципы доказательной медицины.

Практические рекомендации. В данном разделе выставлены 8 предложений, которые значимы и информативны для программных документов и циклов повышения квалификации медицинских микробиологов и клиницистов любого профиля и могут быть включены в практическую работу бактериологических лабораторий любого уровня.

Соответствие специальности. Сформулированные 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. В целом диссертация Н.М. Каргальцевой производит благоприятное впечатление, особенно вкус и техника оформления рисунков. Изучение материалов диссертации вызвало следующие вопросы дискуссионного характера, ответы на которые могут послужить углубленному представлению по проблеме инфекции кровотока.

1. В чем заключается приоритетность используемого в Вашей работе «метода оценки вирулентности» у грибов рода *Candida* по обнаружению «нитей мицелия» в микроскопических мазках, по сравнению с широко используемым методом по «ростовым трубочкам» микроорганизма.
2. Ваше отношение о целесообразности применения разработанной системы диагностики инфекции кровотока в группе детей ЧДБ (часто и длительно болеющих) ОРИ с синдромом «субфебрилитета».

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, решена важная практическая проблема здравоохранения, 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

Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения « Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУ ДНК ЦИБ ФМБА России)

Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул.Профессора Попова, д.9.

Тел: +7 (812) 234-60-04

E-mail: nii_detinf@fmbamail.ru

доктор медицинских наук, профессор *Кветная* Кветная Ася Степановна

12.09.2022
Подпись ведущего научного сотрудника научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, доктора медицинских наук, профессора Кветной Аси Степановны заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «Детский научно-клинический центр

инфекционных болезней» ФМБА России, к.м.н.

Волжанин
Валерий Михайлович Волжанин

