

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, заведующего лабораторией молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Чеботаря Игоря Викторовича на диссертационную работу Мартенс Эльвиры Акрамовны на тему: «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. - Микробиология (медицинские науки)

Актуальность темы исследования

Neisseria meningitidis является возбудителем антропонозной менингококковой инфекции. Этот грамотрицательный микроорганизм способен вызывать угрожающие жизни инфекционные болезни, среди которых наиболее опасными являются генерализованные формы, включая менингококцемию, сепсис и менингит. Генерализованная форма менингококковой инфекции непредсказуема по течению и характеризуется высоким риском летальных исходов (8–15%), которые при септическом шоке и тяжелом сепсисе достигают 40–80%. Возможность развития генерализованных форм менингококковой инфекции зависит от двух главных условий - от индивидуальных особенностей пациента и от вирулентного (главным образом инвазивного) потенциала конкретного штамма *N. meningitidis*.

Большинство взаимодействий между популяциями *N. meningitidis* и организмом человека являются клинически незаметными, поскольку менингококк адаптирован к колонизации и выживанию на слизистой оболочке носоглотки хозяина. Однако в некоторых случаях менингококк способен проникать сквозь барьер слизистой оболочки носоглотки и диссеминироваться в организме, ускользая от иммунного ответа.

Основной путь решения проблемных вопросов диагностики и лечения инфекционных заболеваний нервной системы заключается в непрерывном клинико-лабораторном и эпидемиологическом мониторинге с анализом полученных характеристик. В связи с этим диссертационная работа Э.А. Мартенс, в которой детально проанализированы фенотипические и генотипические характеристики штаммов *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных и носителей, является актуальным исследованием, способствующим совершенствованию эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией для прогнозирования течения эпидемического процесса и выбора научно-обоснованной программы иммунопрофилактических и лечебных мероприятий.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Проведенная Э.А. Мартенс работа позволила охарактеризовать популяционную структуру циркулирующих в Санкт-Петербурге штаммов *N. meningitidis*. Выявлена высокая сиквенс-типовая и клональная гетерогенность изолированных менингококков, включающая 12 сиквенс-типов и 8 клональных комплексов. При этом три сиквенс-типа (ST-1136, ST-2146 и ST-9126) и три клональных комплекса (CC174, CC198 и CC1136) ранее в России не встречались. Установлено, что российские изоляты серогруппы W, относящиеся к ST-11 (W-ST11), образуют отдельную генетическую линию, тесно связанную с англо-французской и шведской кладами кластера Hajj, которая, в свою очередь, делится на три сублинии (одна - изоляты из Москвы и две - изоляты из Санкт-Петербурга). Среди штаммов менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, выявлено преобладание серогруппы B.

Автором впервые проведена оценка соответствия антигенного состава субкапсулярных вакцин 4СМенВ и rLP2086 и менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Установлено, что нетипируемые штаммы *N. meningitidis*, несущие локус *cnl*, распространенные в основном среди здоровых носителей, могут вызывать и генерализованные формы менингококковой инфекции у детей в возрасте от 0 до 17 лет. В результате проведенного исследования впервые установлено, что снижение чувствительности к пенициллину у менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, связано с формированием мутаций в гене *penA*. Автор выявил корреляцию между указанными мутациями и повышенными значениями МПК пенициллина, определяемыми методами серийных разведений в агаре и градиентной диффузии. Повышенные значения МПК пенициллина, определяемые методом серийных разведений в бульоне, не коррелировали с указанными мутациями.

Представленные в работе данные свидетельствуют о высоком потенциале и практической ценности использования полученных результатов в практическом здравоохранении.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Мартенс Э.А. обусловлена использованием современных фенотипических и молекулярно-генетических методов, большим объемом экспериментальных данных и их корректной статистической обработкой.

Положения, выносимые на защиту аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и научно обоснованы, соответствуют содержанию представленной работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Охарактеризованные в рамках данной работы *N. meningitidis*, выделенные от больных и носителей, открывают новые перспективы в понимании молекулярной эпидемиологии менингококковой инфекции. Благодаря этому дополнены теоретические представления о распространении глобальных генетических линий и их эволюции на локальном уровне, что позволяет обосновать стратегию профилактики и лечения менингококковых инфекций.

Особый практический интерес представляет обнаружение доминирования изолятов серогруппы В среди менингококков, циркулирующих в Санкт-Петербурге, что обосновывает необходимость внедрения в практику иммунопрофилактики менингококковых инфекций вакцин, обеспечивающих защиту от инфицирования бактериями этой серогруппы. В то же время, на основании полученных данных можно предположить, что современные субкапсулярные вакцины 4CMenB и rLP2086 могут обеспечить протективный эффект в отношении соответственно 28,6% и 42,9% менингококков серогруппы В, циркулирующих в Санкт-Петербурге. Очевидна необходимость разработки отечественной вакцины в большей степени соответствующий антигенному составу циркулирующих в Российской Федерации менингококков.

Результаты проведенной работы показали, что в настоящее время цефтриаксон может рассматриваться в качестве надежного средства эмпирической терапии менингококковых инфекций, поскольку устойчивости к этому антибиотику среди менингококков не выявлено. Однако снижение чувствительности к пенициллину, обусловленное мутациями в гене *penA* белка, может быть начальным этапом формирования устойчивости к цефалоспорином. Указанная негативная тенденция обосновывает необходимость внедрения стандартных и воспроизводимых методов оценки чувствительности менингококков к антибактериальным препаратам. Значимым практическим результатом

является то, что методы оценки чувствительности менингококков в агаре (серийных разведений и градиентной диффузии), позволяют получить более достоверные результаты по сравнению с методом серийных разведений в бульоне. Методы оценки чувствительности в агаре могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике здравоохранения. Показано, что внедрение молекулярных методов в алгоритм диагностики менингококковых инфекций и типирования возбудителя позволяет существенно сократить срок исследования и обеспечить идентификацию и типирование как жизнеспособных изолятов *N. meningitidis*, так и их ДНК непосредственно из биологического материала.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных и Всероссийских научно-практических конференциях и конгрессах.

Материалы диссертационной работы внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ.

Предложения по совершенствованию лабораторной диагностики менингококковой инфекции внедрены в работу клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», а также в работу специализированной централизованной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 22».

По теме диссертации Мартенс Э.А. опубликовано 10 научных работ, из которых 3 – статьи в рецензируемых изданиях, 5 статей – в других изданиях, 2 тезисов в материалах конференций.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Автором сформулированы цель и задачи исследования, проведена значительная часть лабораторных исследований, оптимизирован алгоритм исследования для этиологической расшифровки менингококковой инфекции.

Для определения антибиотикочувствительности установлено, что эпсилومترический метод (Е-тест) и метод диффузии в агаре могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике здравоохранения. При оценке антибиотикочувствительности установлено, что для лечения в качестве препаратов выбора рекомендованы цефалоспорины третьего поколения (цефтриаксон или цефотаксим), а для профилактики – ципрофлоксацин или цефтриаксон, или рифампицин с учетом возрастных ограничений.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы. Общий объем диссертации, включая 6 таблиц, 30 рисунков, составляет 136 страниц. Список литературы состоит из 206 источников.

В разделе «Введение» обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, представлены материалы исследования, описаны фенотипические и молекулярные методы исследования.

В первой главе автор описывает общие характеристики *N. meningitidis*, а также анализирует диагностические подходы детекции этого возбудителя, включая классические культуральные и современные молекулярные методы. Большое внимание уделено типированию *N. meningitidis* при помощи фенотипических и молекулярных методов. В первой главе описана глобальная эпидемиология менингококковой инфекции с детальным анализом возникновения и распространения некоторых сиквенс-типов. Автор характеризует популяционную структуру *N. meningitidis* и возможные направления стратегии вакцинации. Описаны профили чувствительности исследованных изолятов *N. meningitidis* к антимикробным препаратам и механизмы резистентности к различным группам антибактериальных препаратов.

Во второй главе автором изложены результаты выявления *N. meningitidis* в материалах от пациентов с подозрением на гнойный менингит и/или менингококковую инфекцию и клинически здоровых носителей. Кроме этого, представлены результаты типирования изолированных штаммов *N. meningitidis* из образцов от пациента генерализованными формами менингококковой инфекции и носителей. Детально описаны условия проведения ПЦР. Для нетипируемых образцов были описаны условия для определения специфического «нулевого локуса капсулы» (*cnl*). Автор описала алгоритм диагностики менингококковой инфекции. Было показано, что применение метода ПЦР позволило расширить масштабы обнаружения *N. meningitidis* (на 50% - 64%). Было установлено, что в Санкт-Петербурге среди изолятов, выделенных от больных, доминируют изоляты, относящиеся к серогруппе В (45% от всех пациентов). Автором была проведена оценка эффективности существующих вакцин против менингококка серогруппы В с помощью определения MenDeVAR Index. Были получены данные о том, что иммуногенные компоненты вакцины 4CMenB (Bexsero), а именно, один из

геномных белков (фактор Н, связывающий белок, fHbp) имеет перекрестную реактивность с антигенами двух изолятов из семи: fHbp_peptide:37. В трех случаях из семи имеется перекрестная реактивность компонентов вакцины Trumenba с антигенами изолятов: fHbp_peptide:25. Важно то, что в работе не было обнаружено ни одного точного и полного соответствия между последовательностями аминокислот у реальных изолятов менингококков и последовательностями аминокислот в составе вакцинных антигенов. Лишь отдельные пептиды изолятов *N. meningitidis* соответствуют вариантам вакцин против менингококков серогруппы В. Автором представлены результаты, которые крайне важны для обоснования стратегии вакцинопрофилактики менингококковой инфекции.

В третьей главе автор сравнил методы определения антибиотикочувствительности *N. meningitidis*, поскольку тестирование чувствительности менингококков к антибиотикам осложняется сохраняющимся до настоящего времени отсутствием единого мнения относительно выбора оптимального метода исследования, а также неоднозначной интерпретацией значений минимальных подавляющих концентраций антибактериальных препаратов. Были использованы 3 метода постановки антибиотикочувствительности: 1) методы разведения в агаре, 2) методы градиентной диффузии (Е-тест), 3) метод серийных разведений. В результате было показано, что при определении МПК (мг/л) тремя методами отмечалась удовлетворительная воспроизводимость для всех исследуемых антибиотиков. Метод с использованием МИС-полосок (Е-тест) и метод разведений в агаре показали более точную воспроизводимость. парадоксально, что полученные при помощи метода серийных разведений результаты снижения чувствительности к антибиотикам, часто не подтверждались молекулярными методами. Автор определила, что количество изолятов со сниженной чувствительностью к

маркерному антибиотику – бензилпенициллину - больше в группе изолятов, выделенных от больных (38%), чем в группе здоровых носителей. К цефтриаксону, меропенему, а также к ципрофлоксацину сохраняется чувствительность (100%) как в группе изолятов, выделенных от больных, так и в группе изолятов, выделенных от носителей. Обнаружены единичные изоляты, устойчивые к рифампицину и хлорамфениколу как у носителей, так и у больных ГФМИ. Было установлено отсутствие корреляций между сниженной чувствительностью изолята *N. meningitidis* к тестируемым антибактериальным препаратам и его принадлежностью к той или иной серогруппе.

В четвертой главе автором представлены результаты проведенного полногеномного секвенирования. Была установлена связь выделенных изолятов менингококков с представителями гипервирулентных линий. В связи с глобальным распространением *N. meningitidis* серогруппы W по всему миру, были зарегистрированы местные случаи выделения *N. meningitidis* серогруппы W как среди больных, так и среди носителей. Автор проанализировала распределение изолятов по кладам и обосновала ряд предположений относительно родственных связей/происхождения представителей Санкт-Петербургских генетических линий. Было установлено, что среди носителей и больных ГФМИ циркулируют штаммы менингококков, относящиеся к различным сиквенс-типам (ST), три из которых (ST-1136, ST-2146, ST-9126) были детектированы впервые в Российской Федерации, и соответствующие клональные комплексы (CC1136, CC198, CC174) были впервые выявлены в нашей стране. Было доказано, что среди нечувствительных к пенициллину изолятов аминокислотная замена D350N в *penA* обнаружена у двух, а комбинация аминокислотных замен F504L, A510V и N512Y в *penA* - у 12. Изоляты с пониженной чувствительностью к пенициллину относятся к ST-10023, ST-7926, ST-8256, ST-12758, ST-9126, ST-11 и ST-75. Гены *penA* и *ponA*

дикого типа наблюдались во всех чувствительных к пенициллину изолятах. Мутации в *rpoB* (A473T, H481N и A473T) были связаны с устойчивостью к рифампицину. Типирование изолятов НИИДИ-ДНКЦИБ по генам вирулентности и исследование их филогенетических отношений с Хадж-кластером показало принадлежность к этой глобальной группе *N. meningitidis*. Автором был сделан вывод, что при условии отсутствия введения вакцинации от W-серогруппы *N. meningitidis* существует опасность очередного подъема заболеваемости менингококковой инфекцией в Санкт-Петербурге. Несмотря на высокую вирулентность, исследуемые изоляты проявляют хорошую чувствительность к основным используемым антибиотикам - пенициллину, рифампицину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину, макролидам и фторхинолонам.

Выводы обоснованы и подтверждены полученными результатами. Сформулированы практические рекомендации, которые важны для практического здравоохранения.

Автореферат отражает основное содержание диссертационной работы, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами, которые описывают значимые результаты работы.

Суммируя вышеизложенное, следует отметить, что представленная диссертационная работа, является исследованием, обладающим новизной, выполненным в целом корректно и на высоком методическом уровне, результаты которого представляют практический интерес, что дает возможность сделать заключение о высоком уровне научной и профессиональной подготовке соискателя.

Соответствие специальности

По тематике, объектам исследования, методам исследования, основным положениям и выводам, сформулированных автором,

представленная диссертационная работа соответствует специальности 1.5.11.- Микробиология.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие замечания:

1) Говоря о физических размерах *N. meningitidis*, автор указывает, что это - «грамотрицательный диплококк, величиной 0,6-1,0 мкм» (стр. 33 диссертации), что является неточностью. Более корректное определение размеров *N. meningitidis* должно звучать как «грамотрицательный диплококк, каждая из составляющих диплококк клеток имеет диаметр 0,6-1,0 мкм».

2) Имеются немногочисленные стилистические и грамматические ошибки, включая отсутствие пробелов знаком препинания и следующим за ним словом (стр. 58), различия в написании акронима клонального комплекса (clonal complex) - в одних случаях он обозначен заглавными буквами (например, на стр. 53 - «СС41/44, СС269, СС213 и СС32»), в других - строчными буквами (например, на стр. 59 - «сс4821»).

В качестве дискуссии хотелось бы задать автору несколько вопросов, которые позволили бы автору высказать свое мнение по поводу проблемных вопросов, касающихся характеристик *N. meningitidis*:

1) Как изменялись МПК контрольного штамма *Streptococcus pneumoniae* ATCC 46619 при оценке чувствительности к антимикробным препаратам при помощи различных способов (Е-тесты, метод разведений в агаре и метод серийных разведений)?

2) В разделе «Обзор литературы» автор описала феномен повторов в генетическом аппарате менингококков. Не встречалась ли при анализе данных полногеномного секвенирования изученных изолятов *N. meningitidis* мультикопийность генов пенициллинсвязывающих белков?

3) Не мог бы диссертант более детально расшифровать степень родства между вновь обнаруженными в Санкт-Петербурге сиквенс-типами

N. meningitidis и известными эпидемически опасными клональными комплексами с позиции MLST-типирования? В частности, встречались ли среди обнаруженных диссертантом сиквенс-типов *N. meningitidis* варианты, являющиеся сингл- или дабл-локус вариантами известных эпидемически значимых клональных комплексов?

Отмеченные замечания не носят принципиального характера и не снижают положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

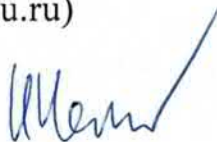
Диссертационная работа Мартенс Эльвиры Акрамовны на тему: «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология, выполненной под руководством члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Сидоренко Сергея Владимировича, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи (проблемы) – стратегии вакцинопрофилактики. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Мартенс Эльвиры Акрамовны отвечает требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020, от 26.09.2022 № 1690 «О внесении изменений в Положение о

присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Мартенс Эльвира Акрамовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11.– Микробиология (медицинские науки).

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярной микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) (117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1. Телефон: +7 (495) 434-14-22, e-mail: uchsovet@rsmu.ru)

Доктор медицинских наук



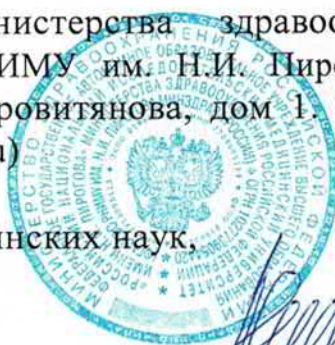
Чеботарь Игорь Викторович

«09» января 2023 г.

Подпись Чеботаря Игоря Викторовича заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) (117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1. Телефон: +7 (495) 434-14-22, e-mail: uchsovet@rsmu.ru)

Кандидат медицинских наук,
доцент



Демина Ольга Михайловна