

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора **Червинца Вячеслава Михайловича** на диссертационную работу **Оганесяна Айка Наириевича** «Молекулярно-генетическая характеристика *Streptococcus pneumoniae* и эпидемиологические аспекты пневмококковых менингитов у детей», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### Актуальность темы исследования

Гнойный бактериальный менингит (ГБМ) – одно из наиболее опасных жизнеугрожающих заболеваний, которое характеризуется быстрым течением, сопровождается высокой летальностью и нередко приводит к инвалидизации пациентов. Особое место в структуре заболеваемости бактериальными гнойными менингитами занимает пневмококковый менингит. По разным оценкам уровень летальности при пневмококковом менингите варьирует в пределах от 10 - 13% в развитых странах и до 55 % - в развивающихся, а наиболее высокая заболеваемость наблюдается в возрастных группах до 2 лет и старше 50 лет. Ежегодно в мире пневмококковый менингит приводит к смерти или инвалидизации более чем 60,000 детей в возрасте до 5 лет.

Совершенствование иммунохимических и внедрение молекулярно-генетических методов в эпидемиологические исследования позволили установить, что на глобальном уровне более 80% тяжелых инвазивных пневмококковых инфекций, в том числе менингит, вызываются 20 серотипами возбудителя, однако состав превалирующих серотипов различен на отдельных географических территориях, а также меняется со временем в результате влияния вакцинации, миграции, изменений возрастного состава населения, возникновения и экспансии различных клональных комплексов *Streptococcus pneumoniae*.

Возможность эффективной профилактики пневмококковых инфекций, представляющих серьезную угрозу здоровью детей, появилась более 10 лет назад после внедрения в практику первой 7-валентной пневмококковой

конъюгированной вакцины (ПКВ7). В настоящее время ПКВ введены в Национальные программы иммунизации более 70 стран мира. Опыт применения ПКВ в различных регионах мира указывает на их высокую эффективность по отношению к инвазивным пневмококковым инфекциям (ИПИ). Наблюдается существенное снижение заболеваемости ИПИ, вызванной ими смертности, а также встречаемости серотипов *S. pneumoniae*, включенных в ПКВ, как среди штаммов, вызывающих инвазивные формы инфекции, так и среди выделяемых от здоровых носителей (популяционный эффект).

Вместе с тем, в силу того, что серотиповой пейзаж возбудителя пневмококковой инфекции изменчив во времени и различается на разных географических территориях, наличие эффективной системы мониторинга его изменений является необходимым условием для выбора оптимальной стратегии вакцинопрофилактики, а также оценки ее результативности. В последние годы исследования по изучению популяционной структуры пневмококков интенсивно проводятся, как в России, так и за рубежом. Однако данные об этиологической структуре возбудителей и циркуляции вирулентных клонов пневмококков на территории приграничных с РФ стран, из которых идут интенсивные миграционные потоки населения, практически отсутствуют.

В связи с этим, диссертационная работа, выполненная Оганесяном Айком Наириевичем, и посвященная молекулярно-генетической характеристике и изучению эпидемиологических аспектов пневмококковых менингитов у детей на территории отдельных стран Европейского региона ВОЗ и Российской Федерации, является безусловно актуальной для практического здравоохранения.

#### **Степени новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В диссертационной работе представлен модифицированный протокол мультиплексной полимеразной цепной реакции с детекцией в агарозном геле, основанный на использовании четырёх комбинаций праймеров. Подобранный оптимизированный состав реакционной смеси и условия амплификации, обеспечивающие высокую специфичность реакций и позволяющие получать

ампликоны разных размеров для их одновременной идентификации. Данная модификация позволяет повысить эффективность серотипирования штаммов пневмококков при диагностике бактериальных менингитов.

Разработан и научно обоснован двухэтапный алгоритм серотипирования с применением полимеразной цепной реакции, основанный на идентификации генов-мишеней: *wzy*, *wzx*, *wzg* (*cpsA*), *galU*, *wciP*, *wcwL*, *wcrG*, *wciL*, *wcwV*, *wcrH*, позволяющий определить 41 серотип и серогруппу за 11 реакций. Предложенная автором адаптированная к условиям исследуемых стран схема серотипирования пневмококков позволила определить серотип возбудителя в 75% исследованных образцов, что несомненно имеет большое теоретическое и практическое значение.

Серотиповой пейзаж циркулирующих на исследуемых территориях штаммов *S. pneumoniae* включал 4 превалирующих сероварианта: 6A/B, 14, 19F, 23F. Процент покрытия выявленных на исследованных территориях серотипов 10 валентной пневмококковой конъюгированной вакциной составил 60,5%. Автором представлены данные, характеризующие распространение возбудителя с учетом регионального и странового аспекта, исследован серотиповой состав пневмококков, как возбудителей менингита у детей, на территории Азербайджана, Армении, Грузии, Белоруссии и Украины, что определяет высокое медико-социальное значение выполненного исследования.

Проведенный автором анализ серотипового состава *S. pneumoniae* на исследуемых территориях на начальном этапе вакцинопрофилактики определил различия эффективности применения ПКВ в плановом порядке и по эпидпоказаниям. Показано отсутствие изменений в структуре серотипового состава *S. pneumoniae* при вакцинации только по эпидпоказаниям. Полученные данные могут быть применены при разработке оптимизированных к условиям исследуемых регионов схем вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции.

С применением метода мультилокусного сиквенс-типирования охарактеризована популяционная структура выделенных штаммов *S. pneumoniae*, как возбудителей гнойного бактериального менингита.

Впервые выявлены и импортированы в международную базу Streptococcus PubMLST (<https://pubmlst.org>) под идентификационными номерами: 42328 (СТ 14372); 42334 (СТ 14386); 42335 (СТ 14387); 42336 (СТ 14388) 4 новых сиквенс-типа возбудителя, что определяет научную новизну полученных Оганесяном А.Н. результатов.

При проведении филогенетического анализа выявлены два тесно связанных кластера и один клональный комплекс *S. pneumoniae*, что свидетельствует о близком родстве исследованных штаммов и позволяет сделать выводы о путях распространения пневмококков на исследованных территориях.

Данные, полученные из ведущих профильных стационаров Азербайджанской Республики и Республики Армения за период с 2010 по 2017 гг. и с 2013 по 2017 гг., соответственно, позволили оценить заболеваемость бактериальными гнойными менингитами пневмококковой этиологии в возрастной группе детей до 5 лет, которая составила в среднем 0,9 и 1,96 случая на 100 тыс. детского населения, с преобладанием случаев заболевания среди детей первого года жизни.

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

Оценка изменения серотипового пейзажа *S. pneumoniae*, как возбудителей менингита у детей до 5 лет, на исследуемых территориях позволяют получить представление о характере изменений серотипового пейзажа в условиях вакцинации, что необходимо для принятия управленческих решений по выбору схемы вакцинации и валентности вакцинного препарата при проведении иммунопрофилактики пневмококковой инфекции.

Информативность использованных при серотипировании пневмококков генов-мишеней: *wzy*, *wzx*, *wzg* (*cpsA*), *galU*, *wciP*, *wcwL*, *wcrG*, *wciL*, *wcwV*, *wcrH*, и двухэтапный алгоритм серотипирования с применением полимеразной цепной реакции, позволили сократить число ПЦР реакций с 15 до 11 и время проведения анализа до 18 часов. Предложенная модифицированная схема мультиплексной полимеразной цепной реакции позволила идентифицировать серотипы в 78%

проб с положительной детекцией *S. pneumoniae*.

Предложенная модификация схемы серотипирования позволяет оптимизировать серологический мониторинг *S. pneumoniae*, необходимый для эффективного эпидемиологического надзора, что обуславливает высокую практическую значимость разработанной автором схемы. Необходимо отметить, что предложенная Оганесяном А.Н. схема серотипирования пневмококков адаптирована к условиям исследуемых территорий и позволяет идентифицировать подавляющее большинство высокоинвазивных штаммов пневмококка, что крайне важно при планировании и проведении вакцинации. Применение разработанной схемы показало, что введение ПКВ10 на отдельных территориях по эпидпоказаниям не отразилось на серотиповом пейзаже циркулирующих штаммов *S. pneumoniae*. Полученные в диссертационной работе результаты подтверждают целесообразность применения пневмококковых конъюгированных вакцин в плановом порядке.

Безусловно важным является создание рабочей коллекции ДНК *S. pneumoniae*, которая будет использована в дальнейших исследованиях с целью прогнозирования распространения эпидемически значимых штаммов и молекулярно-генетического мониторинга популяции возбудителя.

Результаты проведенных исследований были импортированы в базу Всемирной организации здравоохранения по эпидемиологическому надзору за гнойными бактериальными менингитами в ряде стран Европейского региона Всемирной организации здравоохранения. Полученные Оганесяном А.Н. результаты включены в ежегодно издаваемый эпидемиологический бюллетень Всемирной организации здравоохранения по наблюдению за гнойными бактериальными менингитами в ряде стран Европейского региона Всемирной организации здравоохранения (WHO Global Invasive Bacterial Vaccine-Preventable Disease and Rotavirus and Pediatric Diarrhea Surveillance Networks Bulletin, January 2019), представление полученных результатов на международном уровне, подтверждает их высокую значимость.

Методики и разработки, представленные в диссертационной работе

Оганесяна А.Н., внедрены в научно-исследовательскую работу Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 09.01.2019 г.) и в научно-исследовательскую работу Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (акт внедрения от 21.01.2019 г.).

Материалы данного исследования могут быть включены в профессиональные образовательные программы высшего образования медицинских ВУЗов, при подготовке кадров высшей квалификации в ординатуре, а также в программы повышения квалификации специалистов системы здравоохранения в рамках непрерывного медицинского образования.

Перспектива дальнейшей разработки темы определена автором, следующим образом:

1. Дальнейший филогенетический анализ циркулирующих штаммов *S. pneumoniae* необходим для совершенствования системы эпиднадзора за пневмококковой инфекцией.

2. Продолжение исследований по изучению молекулярно-генетических механизмов антибиотикорезистентности у штаммов *S. pneumoniae*.

3. Для снижения уровней заболеваемости бактериальными гнойными менингитами у детей, необходимы исследования по выявлению возможных источников инфекции среди их ближайшего семейного окружения.

Избранное автором направление исследований имеет высокое теоретическое и практическое значение и требует дальнейшего продолжения для решения актуальных проблем микробиологической диагностики и эпидемиологического надзора за пневмококковой инфекцией.

## **Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения и определяется правильными теоретическими положениями, основанными на знании современной литературы, методологически верифицированными исследованиями, выполненными с применением современных бактериологических, иммунохимических и молекулярно-генетических методов. Примененные методы статистической обработки полученных результатов являются общепринятыми и позволяют оценить достоверную значимость полученных данных.

Основными объектами исследования в представленной диссертационной работе являлись молекулярно-генетические и филогенетические свойства циркулирующих штаммов *S. pneumoniae*, как возбудителей гнойного бактериального менингита (ГБМ), а также отдельные проявления эпидемического процесса пневмококкового менингита. Предметом исследования являлись ДНК и штаммы *S. pneumoniae*, выделенные из спинномозговой жидкости (СМЖ) детей больных ГБМ, а также данные регистрации случаев заболевания и результаты лабораторных исследований.

Результаты диссертационной работы основаны на большом объеме фактических данных. В период с 2010 по 2018 гг. исследовано 3303 образцов СМЖ и 36 штаммов *S. pneumoniae*. Результаты МЛСТ штаммов *S. pneumoniae* обработаны с применением современных методов биоинформационного анализа. Таким образом, основные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные автором, являются логически обоснованными и достоверными.

Актуальность и значимость представленной диссертационной работы Оганесяна А.Н. определяется также тем, что исследование выполнено при реализации программы Европейского регионального бюро Всемирной организации здравоохранения по дозорному эпиднадзору за инвазивными бактериальными заболеваниями, управляемыми вакцинацией, в отдельных

странах Европейского региона Всемирной организации здравоохранения.

Основные материалы диссертации были доложены на международных и российских конференциях, посвященных вопросам диагностики и профилактики бактериального гнойного менингита.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в 9 печатных работах, включающих 3 публикации в рецензируемых изданиях, 1 публикацию в тезисах рецензируемых изданий, 1 публикацию на электронном ресурсе конференции, 4 – в материалах конференций.

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

Диссертационная работа Оганесяна Айка Наириевича построена по общепринятому плану. Материалы диссертации изложены на 145 страницах машинописного текста, иллюстрированы 18 таблицами, 37 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка использованной литературы. Библиографический указатель включает 195 источников литературы, из них 51 отечественных и 144 иностранных авторов.

Во введении представлены актуальность проблемы, цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость работы.

В разделе «Методология и методы исследования» подробно отражены основные направления исследования, дана характеристика обследованного контингента, приведены материалы и методы исследования, представлены методы статистической обработки результатов. Высокий методологический уровень выполненных исследований определяется применением современных молекулярно-генетических методов: мультиплексной ПЦР и мультилокусного сиквенс-типирования.

В обзоре литературы представлены современные сведения о биологических свойствах, факторах патогенности и вирулентности *S. pneumoniae*, особенностях лабораторной диагностики пневмококковой инфекции, включая молекулярно-



генетические методы исследования, эпидемиологический анализ выявления случаев пневмококкового менингита в условиях вакцинопрофилактики. Литературный обзор основан на детальном анализе публикаций отечественных и зарубежных авторов по данной тематике.

В 2 главе «Модификация протокола мПЦР с детекцией в агарозном геле и разработка двухэтапного алгоритма ПЦР-серотипирования *S. pneumoniae*» представлен оптимальный алгоритм ПЦР-серотипирования пневмококков, позволяющий снизить число реакций с 15 до 11 и определять 41 из 98 известных в настоящее время серотипов *S. pneumoniae*.

В третьей главе «Серотиповая характеристика и оценка изменений серотипового пейзажа *S. pneumoniae* в условиях вакцинопрофилактики в ряде стран Европейского, Закавказского и Азиатского регионов» автор анализирует данные о распространении серогрупп и серотипов пневмококков на территориях Азербайджанской Республики, Украины и Армении. Выявлен процент серотипов пневмококков, входящих в состав применяемых на данных территориях конъюгированных пневмококковых вакцин ПКВ10 и ПКВ13. В условиях применения ПКВ 10 на Украине по эпидпоказаниям, выявлено увеличение частоты встречаемости вакцинных штаммов пневмококков. Таким образом, применением ПКВ по эпидпоказаниям не оказывает выраженного влияния на циркуляцию пневмококков, в отличие от регионов с плановым режимом применения пневмококковых конъюгированных вакцин.

В четвертой главе «Генотипическая характеристика и филогенетический анализ штаммов *S. pneumoniae*» представлены результаты МЛСТ-типирования и филогенетического анализа штаммов, полученных из Армении, Азербайджанской Республики и Украины. Выявлена взаимосвязь штаммов новых СТ14388 и СТ14386, циркулирующих на территории Республики Армения, с высоко инвазивным и широко распространенным во всем мире, штаммом СТ320. Показано близкое родство штамма нового СТ14372 со штаммом СТ235, циркулирующим в основном на Европейской территории. Штамм нового СТ14387, выявленный на территории Республики Армения, имеет близкое

родство со штаммом редкого СТ2436, выявленным в настоящем исследовании на территории Украины. Ранее, согласно данным литературы, СТ2436 встречался только на территории Соединенного Королевства Великобритании и Северной Ирландии. Полученные результаты являются высоко актуальными для оценки популяционной структуры и возможных путей распространения инвазивных штаммов *S. pneumoniae*. Новые СТ пневмококков были интегрированы в международную базу Streptococcus PubMLST.

Информация о СТ пневмококков, циркулирующих на территории исследованных стран Европейского региона ВОЗ, получена автором впервые и является актуальной и значимой для при изучении динамики распространения инвазивных штаммов пневмококков и оценки эффективности применения пневмококковых конъюгированных вакцин.

Определение принадлежности изолятов пневмококков к определенным сиквенс-типам и клональным комплексам показало, что выделенные штаммы образуют две тесно связанные группы. В группу I были включены штаммы сиквенс-типов, встречавшихся на Украине, и штамм СТ14387, выявленный на территории Республики Армения. Следует отметить, что штамм СТ246, широко распространенный в Японии и в некоторых странах Европы, является родственным для большинства пневмококков группы I. Группа II включала в основном штаммы сиквенс-типов, обнаруженных в странах Кавказского региона, а также штаммы глобально распространенного СТ473, который был выявлен в Азербайджанской Республике и на Украине. В группе II “центральным” является штамм, относящийся к широко распространенного по всему миру высоко инвазивному СТ320.

Полученные данные вносят существенный вклад в исследование генетической структуры пневмококковой популяции в РФ и соседних странах, которая является недостаточно изученной.

В пятой главе «Анализ данных дозорного эпиднадзора и характеристика уровней заболеваемости пневмококковым менингитом детей до 5 лет» приведен статистический анализ выявленных случаев пневмококкового менингита у детей

до 5 лет. Основываясь на данных, полученных из стационаров республиканского уровня, автор проводит оценку заболеваемости пневмококковым менингитом с учетом общего числа детей данной возрастной группы на исследуемых территориях. Показано, что заболеваемость пневмококковым менингитом в возрастной группе детей до 5 при проведении плановой вакцинации против пневмококковой инфекции была сопоставимой с уровнем заболеваемости в Российской Федерации и находилась в пределах от 0,25 до 2,88 случаев на 100 тыс. детского населения. При отсутствии планового эпидемиологического надзора за пневмококковой инфекцией в исследуемых странах полученные Оганесяном Айком Наириевичем данные являются высоко значимыми для практического здравоохранения, принятия управленческих решений и планирования профилактических мероприятий.

В разделе «Заключение» тщательно проанализированы полученные в диссертационной работе результаты, проводится оценка и сопоставление полученных данных с имеющимися в мировой научной литературе сведениями, касающимися вопросов современной лабораторной диагностики, патогенеза и эпидемиологии пневмококковой инфекции.

Выводы достоверны и убедительны, логически следуют из полученных в ходе работы результатов и полностью соответствуют поставленным задачам.

Таким образом, диссертационная работа Оганесяна Айка Наириевича является завершенным научным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью. Результаты диссертационной работы могут быть использованы для оптимизации микробиологической диагностики и организации молекулярно-эпидемиологического мониторинга пневмококковой инфекции. Автореферат полностью соответствует содержанию работы.

### **Соответствие специальности**

Кандидатская диссертация Оганесяна А.Н. полностью соответствует специальности 03.02.03 – микробиология.

В процессе рецензирования диссертационной работы возник ряд вопросов:

1. Чем объясняется низкий процент выделения штаммов *S. pneumoniae* при исследовании ликвора, полученного от пациентов с клиническим диагнозом менингит?

2. Какую долю занимали *S. pneumoniae* в общей этиологической структуре возбудителей бактериальных гнойных менингитов в исследованной группе детей младше 5 лет?

3. Насколько эффективны пневмококковые конъюгированные вакцины?

Выявленные замечания и поставленные вопросы не снижают общей высокой оценки научной и практической ценности рецензируемой работы.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Оганесяна Айка Наиревича «Молекулярно-генетическая характеристика *Streptococcus pneumoniae* и эпидемиологические аспекты пневмококковых менингитов у детей», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук Воропаевой Е.А. и кандидата медицинских наук Мельниковой А.А., и содержащей решение актуальной научно-практической задачи: изучение молекулярно-генетических особенностей штаммов *S. pneumoniae* и эпидемиологических аспектов пневмококковых менингитов у детей для оптимизации микробиологического мониторинга в условиях применения пневмококковых конъюгированных вакцин.

Диссертационная работа Оганесяна Айка Наиревича на тему «Молекулярно-генетическая характеристика *Streptococcus pneumoniae* и эпидемиологические аспекты пневмококковых менингитов у детей» по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации N 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации N

335 от 21 апреля 2016 года, N 748 от 2 августа 2016 года, N 650 от 29 мая 2017 года, N 1024 от 28 августа 2017 года, N 1168 от 01 октября 2018 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор – Оганесян Айк Наиревич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

### **Официальный оппонент**

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор

**Червинец Вячеслав Михайлович**

Адрес: 170100 г. Тверь, ул. Советская, д. 4.

Тел. +7 (4822) 32-17-79 Факс +7 (4822) 34-43-09, [info@tvigma.ru](mailto:info@tvigma.ru)

Дата: «17» сентября 2019 года

Подпись доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кандидат биологических наук, доцент



Валерия Геннадьевна Шестакова