

О Т З Ы В

официального оппонента, кандидата медицинских наук, старшего научного сотрудника, ведущего научного сотрудника отдела бактериальных инфекций, заведующего лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации Жуховицкого Владимира Григорьевича на диссертационную работу Мартене Эльвиры Акрамовны на тему: «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (медицинские науки)

Диссертационная работа Э.А. Мартене «Фенотипическая и генотипическая характеристика *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами инфекции и носителей», выполненная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (далее – ДИССЕРТАЦИЯ), посвящена актуальной для микробиологии, эпидемиологии и инфектологии проблеме диагностики, лечения и профилактики менингококковой инфекции.

Актуальность избранной автором ДИССЕРТАЦИИ темы исследования не оставляет сомнений, поскольку до настоящего времени в отечественной микробиологической практике не существует единого, методологически обоснованного подхода к исчерпывающей фенотипической и генотипической характеристике выделенных изолятов *Neisseria meningitidis*, что в значительной степени ограничивает возможности как эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией, так и разработки эффективных средств вакцинопрофилактики. Степень разработанности темы исследования охарактеризована исчерпывающе, дополнительно подчёркивая её актуальность. Таким образом, избранная автором ДИССЕРТАЦИИ тема является актуальным направлением исследования, способствующим более глубокому пониманию проблемы менингококковой инфекции, сохраняющей высокую значимость для научной медицины и практического здравоохранения.

Научная новизна результатов исследования, положенного в основу ДИССЕРТАЦИИ, вполне очевидна: впервые охарактеризована структура популяции *Neisseria meningitidis*, циркулирующая в Санкт-Петербурге; выявлена высокая степень гетерогенности формирующих её штаммов с преобладанием в серогрупповом спектре штаммов серогруппы В; продемонстрировано генетическое своеобразие российских изолятов серогруппы W, образующих отдельную генетическую линию, в свою очередь, подразделяющуюся на три сублинии; проведена оценка соответствия антигенного состава субкапсулярных

вакцин “Bexsero” (“GlaxoSmithKline plc”, Великобритания) и “Trumenba” (“Pfizer Inc.”, США) антигенной структуре штаммов *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге; оптимизированы методы определения чувствительности менингококков к антибактериальным средствам и произведена оценка антибиотикорезистентности выделенных штаммов *Neisseria meningitidis*; показано, что снижение чувствительности к пенициллину у штаммов *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге, связано с формированием мутаций в гене пенициллинсвязывающего белка.

Цель исследования сформулирована достаточно строго, хотя и находится в формальном терминологическом несоответствии названию ДИССЕРТАЦИИ (с. 9).

Формулировка 4-х задач исследования отличается точностью и лаконичностью, хотя отдельные стилистические конструкции вряд ли могут быть расценены как удачные (с. 10, задача 2).

Представленные в ДИССЕРТАЦИИ результаты, полученные в процессе изучения репрезентативных выборок посредством современной методологии исследования, соответствующей уровню заявленной цели и масштабу поставленных задач, а также обработанные с помощью адекватных статистик, могут быть охарактеризованы как достоверные, обосновывающие вытекающие из их совокупности выводы.

Выводы и практические рекомендации, сформулированные в ДИССЕРТАЦИИ, представляют очевидную теоретическую и практическую значимость: комплекс генетических и фенотипических характеристик популяции, циркулирующих в Санкт-Петербурге, дополняет теоретические представления о распространении глобальных генетических линий и их эволюции на локальном уровне, а также позволяет определить стратегию профилактики и лечения менингококковой инфекции; обосновывает необходимость внедрения в практику иммунопрофилактики менингококковых инфекций вакцин, обеспечивающих защиту от инфицирования *Neisseria meningitidis* определённых серогрупп; обосновывает необходимость внедрения стандартизированных методов оценки чувствительности *Neisseria meningitidis* к антибактериальным препаратам и принципы эмпирической терапии менингококковой инфекции.

ДИССЕРТАЦИЯ объёмом 136 страниц, построенная по традиционному плану, включает введение, обзор литературы, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, оценку перспектив дальнейшей разработки темы, а также список цитированной литературы, включающий 206 литературных источника, увидевших свет в период с 1908 по 2022 гг., 17 из которых опубликованы в отечественной печати. ДИССЕРТАЦИЯ содержит 6 таблиц и 30 рисунков, расположенных по тексту.

“Введение” (с. 4 – 30) содержит аргументированное обоснование актуальности темы исследования, оценку степени её разработанности, формулировку его цели и задач, авторскую оценку научной новизны и практической значимости полученных результатов, описание методологии, материалов и методов исследования. Последний фрагмент (с. 14 – 30), содержит весьма подробную характеристику исследованных образцов клинического материала, обследованного контингента больных и бактерионосителей, указания на критерии разделения их на группы, детализированное описание лабораторных методов исследования и применявшихся методик. К сожалению, упомянутый фрагмент не содержит сведений о методике постановки контроля качества экспериментов по оценке антибиотикорезистентности. Не вполне понятно непрокомментированное использование автором в качестве контрольного типового штамма лишь штамма *Streptococcus pneumoniae* (номер которого по каталогу Американской коллекции типовых культур (ATCC), к тому же, указан неверно) но не штамма *Neisseria meningitidis*. Возможно, исходя из соображений композиционной целесообразности, описание методологии, материалов и методов исследования могло бы быть выделено в самостоятельную главу; также нелишними выглядели бы сведения о питательной основе, использовавшейся для приготовления сывороточного агара, об устройстве для оценки оптической плотности бактериальных взвесей, типе использовавшихся механических дозаторов и проч. В целом же, “Введение” отличается необходимой лаконичностью и строгостью изложения.

Глава 1 “Обзор литературы” (с. 31 – 61) содержит рассмотрение значительного по объёму массива данных доступной литературы, посвящённых различным аспектам проблемы менингококковой инфекции: клинико-бактериологическому, эпидемиологическому, профилактическому. К числу несомненных достоинств “Обзора литературы” относится рассмотрение данных литературы в историко-научном и эпидемиологическом контекстах, а также наличие обобщающих заключений по отдельным тематически обособленным фрагментам, отражающих отношение автора к анализируемому материалу. Вместе с тем, “Обзор литературы” не лишен некоторых недостатков: так, отдельные собственные суждения автора не подкреплены соответствующими ссылками на тот или иной источник (с. 38, 40, 55). Наиболее заметным недостатком “Обзора литературы” является отсутствие целостного описания патогенеза менингококковой инфекции, призванного обобщить сравнительно подробное описание отдельных факторов патогенности *Neisseria meningitidis*.

Глава 2 “Детекция *Neisseria meningitidis* в биологических образцах” раздела “Результаты собственных исследований” (с. 62 – 72) содержит обоснование разработанного

автором алгоритма диагностики менингококковой инфекции с последующей фенотипической и генетической характеристикой изолятов и результатов его применения для диагностики генерализованных форм менингококковой инфекции и назофарингеального носительства *Neisseria meningitidis*. Показано, что применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) существенно повышает эффективность микробиологической диагностики как менингококковой инфекции, так и назофарингеального носительства, причём лишь ПЦР обеспечивает выявление вставки нулевого локуса *cnl* гена капсулы у негруппируемых штаммов *Neisseria meningitidis*. Установлено, что среди штаммов *Neisseria meningitidis*, циркулирующих в Санкт-Петербурге, доминируют изоляты серогруппы В (52%), на серогруппы С и W приходится по 15%, на каждую из серогрупп А, Х и Y приходится менее 10%. Также установлено, что изменение серогрупповой структуры менингококков, циркулирующих в обследуемых коллективах, происходит в направлении доминирования негруппируемых штаммов. Наконец, продемонстрировано лишь частичное соответствие антигенной структуры циркулирующих в Санкт-Петербурге штаммов *Neisseria meningitidis* серогруппы В антигенному составу вакцинных препаратов “Bexsero” и “Trumenba”.

В главе 3 “Сравнение методов определения антибиотикочувствительности *Neisseria meningitidis*” раздела “Результаты собственных исследований” (с. 73 – 88) представлены результаты сравнительного изучения эффективности различных методик оценки антибиотикорезистентности штаммов *Neisseria meningitidis*. Показано, что методика градиентной диффузии в агар (Е-тест) и методика серийных разведений в агаре демонстрируют несколько более точную воспроизводимость, нежели методика серийных разведений в бульоне; кроме того, сниженная чувствительность штаммов *Neisseria meningitidis* к антибиотикам, установленная с помощью методики серийных разведений в бульоне, не находит подтверждения с помощью молекулярных методик оценки антибиотикорезистентности. Установлено, что снижение чувствительности к бензилпенициллину, расцениваемому в качестве маркерного антибиотика, чаще встречается среди изолятов, выделенных от больных, нежели от носителей, тогда как чувствительность к цефтриаксону, меропенему и ципрофлоксацину сохраняют все без исключения штаммы, выделенные от представителей обеих групп; в то же время, единичные изоляты, устойчивые к рифампицину и хлорамфениколу, встречались как у больных генерализованными формами менингококковой инфекции, так и у носителей. Весьма существенным результатом выглядит наблюдение автора об отсутствии взаимосвязи между серогрупповой принадлежностью штаммов *Neisseria meningitidis* и сниженной чувствительностью к тестируемым антибактериальным средствам.

Глава 4 “Полногеномное секвенирование *Neisseria meningitidis*” раздела “Результаты собственных исследований” (с. 89 – 97) содержит богатый материал по генотипической характеристике штаммов *Neisseria meningitidis*, выделенных от больных генерализованными формами менингококковой инфекции и бессимптомных носителей. Показано, что штаммы *Neisseria meningitidis*, циркулирующие в Санкт-Петербурге, относятся к 8-ми клональным комплексам и 12-ти сиквенс-типам, три из которых, как и соответствующие клональные комплексы, выявлены на территории Российской Федерации впервые. Установлено, что в пределах глобального кластера *Наjj* штаммы из Российской Федерации образуют отдельную генетическую линию, наиболее близкую к англо-французской и шведской кладам кластера; при этом, российская линия подразделяется на три сублинии – одну, встречающуюся в Москве, и две другие – в Санкт-Петербурге. Кроме того, продемонстрирована связь инвазивности с принадлежностью к кладе: клада А полностью состоит из инвазивных изолятов, в то время как клада В – в значительной степени из штаммов, изолированных от носителей. Наконец, установлена связь между пониженной чувствительностью *Neisseria meningitidis* к пенициллину и принадлежностью к тому или иному сиквенс-типу, а также со структурой генов пенициллинсвязывающих белков.

“Заключение” (с. 98 – 105) критически рассматривает полученные автором результаты, сопоставляя их с данными доступной специальной литературы, обобщает результаты фенотипического и генотипического анализа изученных штаммов *Neisseria meningitidis*, обосновывает необходимость пересмотра существующей стратегии вакцинации против менингококковой инфекции. Хотя материалы ДИССЕРТАЦИИ отражены в “Заключении” в компактной и, вместе с тем, исчерпывающей форме, отсутствие в составе “Заключения” итогового обобщающего фрагмента придаёт ему оттенок незавершённости.

Выводы, сделанные автором и убедительно сформулированные им в соответствующей главе (с. 106), в полной мере отражают полученные результаты собственных исследований, соответствуют цели и задачам диссертационной работы и являются её логическим завершением. Вместе с тем, нельзя не отметить, что вывод 2 мог бы быть разделён на два самостоятельных вывода: отражающего результаты серотипирования штаммов *Neisseria meningitidis* и результаты сиквенс-типирования их соответственно. Аналогичным образом, вывод 3 мог бы быть разделён на два самостоятельных вывода: оценивающего эффективность различных методов определения чувствительности *Neisseria meningitidis* к антибактериальным средствам и результатов определения этой чувствительности соответственно. Вывод 5, возможно, требует расширительной формулировки, поскольку не отражает всей полноты полученных автором результатов изучения соответствия антигенной

структуры циркулирующих в Санкт-Петербурге штаммов *Neisseria meningitidis* серогруппы В антигенному составу применяющихся на практике вакцинных препаратов. Наконец, допущенное автором выражение “серогрупповая принадлежность ДНК” (вывод 1) вряд ли может быть расценено в качестве методологически корректного.

“Практические рекомендации” (с. 107) также отражающие полученные автором результаты исследования, несомненно, представляют интерес для практической бактериологии, эпидемиологии, вакцинологии. Возможно, рекомендация “... проводить *углубленное* изучение выделенных изолятов ...” (п. 3 “Практических рекомендаций”) требует формализации выделенного термина. Рекомендация к использованию в практических лабораториях разработанного автором алгоритма диагностики менингококковой инфекции с последующей фенотипической и генетической характеристикой изолятов (п. 4 “Практических рекомендаций”), возможно, требует дополнительного указания на необходимость оснащения упомянутых лабораторий соответствующим аналитическим оборудованием, позволяющим воплотить в жизнь данную рекомендацию.

Глава “Перспективы дальнейшей разработки темы” (с. 108) очерчивает возможность использования полученных автором результатов для повышения эффективности эпидемиологического надзора за менингококковой инфекцией и разработки эффективных средств вакцинопрофилактики с учётом серогруппового пейзажа циркулирующих популяций *Neisseria meningitidis*.

ДИССЕРТАЦИЯ не лишена отдельных досадных опечаток (с. 7, 15, 26, 27), наиболее заметной из которых является неверное написание названия объекта изучения – в том числе, в оглавлении (с. 3) и в названиях отдельных глав (с. 62, 89).

Автореферат ДИССЕРТАЦИИ объёмом 25 страниц, позволяет составить исчерпывающее представление о её содержании.

ДИССЕРТАЦИЯ и автореферат оформлены надлежащим образом, с соблюдением требований ГОСТ Р 7.0.11-2011 “Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления”.

Личное участие автора в выполнении диссертационной работы заключалось в сборе, анализе научной литературы, планировании экспериментальной части, в выполнении молекулярно-генетических, бактериологических и серологических диагностических исследований, пополнении коллекции изолятов *N. meningitidis*, выделенных от больных и носителей. Также автор принимала участие в выполнении экспериментов по полногеномному секвенированию и работ по биоинформационному анализу. Таким образом, личный

вклад автора ДИССЕРТАЦИИ в выполнение диссертационной работы может быть расценен как достаточный.

Основные результаты ДИССЕРТАЦИИ опубликованы в 10-ти научных работах (в том числе, 3 статьи – в рецензируемых изданиях, 5 статей – в изданиях иного ранга, 2 тезисов – в материалах конференций).

Основные положения ДИССЕРТАЦИИ представлены в 2018-2022 гг. на международных и всероссийских научно-практических конференциях и конгрессах.

Одобрение темы ДИССЕРТАЦИИ работы было получено после проведения этической экспертизы локальным этическим комитетом ФГБУ “Детский научно-клинический центр инфекционных болезней” (ДНКЦИБ) ФМБА России (2018).

Апробация ДИССЕРТАЦИИ состоялась на заседании Ученого Совета ФГБУ “Детский научно-клинический центр инфекционных болезней” (ДНКЦИБ) 28 декабря 2021 года.

Материалы ДИССЕРТАЦИИ внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО “Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова” МЗ РФ, в практику клинико-диагностической лаборатории ФГБУ ДНКЦИБ, специализированной централизованной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 22».

Основные положения ДИССЕРТАЦИИ, выносимые на защиту, в концентрированной форме отражают наиболее важные в смысловом отношении, проблемные аспекты ДИССЕРТАЦИИ.

Исходя из вышеизложенного, следует отметить, что ДИССЕРТАЦИЯ является завершённым исследованием, представляющим несомненный интерес для научной медицины и практического здравоохранения, что свидетельствует о высоком уровне научной и профессиональной подготовке её автора. Отдельные высказанные выше замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую 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, выполненная под руководством члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Сидоренко Сергея Владимировича, является завершённой научно-квалификационной ра-

ботой и содержит новое решение актуальной научной задачи (проблемы) – стратегии вакцинопрофилактики против менингококковой инфекции. 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 индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), ведущий научный сотрудник отдела бактериальных инфекций (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18. Телефон: + 7 (499) 193-30-01, e-mail: info@gamaleya.org)

Кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник

Жуховицкий Владимир Григорьевич

Подпись Жуховицкого Владимира Григорьевича заверяю:

Учёный секретарь Учёного совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; сайт: <https://gamaleya.org>, тел.: + 7 (499) 193-71-71, e-mail: kozhevnikova@gamaleya.org).

Кандидат биологических наук

Кожевникова Людмила Кондратьевна

10 января 2023 года