

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента, **Захаровой Юлии Александровны** на диссертационную работу **Скачковой Татьяны Сергеевны** на тему «**Совершенствование системы эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, на основе молекулярно-биологических методов**», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.2 – Эпидемиология.

Актуальность темы диссертационного исследования

Проблема глобального распространения инфекций, обусловленных метициллинрезистентными стафилококками (MRS), начиная с 60-х годов XX века вскоре после внедрения в практику пенициллиностабильных в-лактамов является крайне актуальной, а в современной научной медицинской литературе нет более встречаемой аббревиатуры, чем MRSA (метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus*), который является основным возбудителем инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) и по данным ВОЗ относится к «критическим» патогенам. Он характеризуется множественной лекарственной устойчивостью, внутрипопуляционной изменчивостью, выраженными факторами агрессии и инвазии, сложными механизмами подавления местного и адаптивного иммунитета. В стационарах MRSA могут выживать в течение длительного времени. Ежегодно в Европе регистрируют до 170 000 MRSA-инфекций. Большой интерес в последние годы представляют коагулазонегативные MRS. Прежде всего *S. epidermidis* (MRSE) и *S. haemolyticus* (MRSH). Исследования в области госпитальной эпидемиологии в последние 10 лет по данной тематике в РФ не проводились.

В современных условиях добиться реального снижения заболеваемости, следовательно, социально-экономических потерь от инфекций, обусловленных MRS, возможно лишь на основе эффективно выстроенной системы эпидемиологического надзора, включая мониторинг за проявлениями эпидемического процесса (эпидемиологический мониторинг) и мониторинг за циркуляцией возбудителя

(микробиологический мониторинг), что позволит решить многие вопросы диагностики, лечения и профилактики.

Уже в 2000-е годы были обнаружены внебольничные резервуары MRSA (CA-MRSA), в центре внимания несколько лет назад оказались MRSA зоонозного происхождения (LA-MRSA), что ставит перед эпидемиологами и микробиологами задачу сдерживания их глобального распространения и дифференциации происхождения с использованием молекулярно-генетических методов.

Учитывая, что генетическая структура MRSA поликлональна, а в его популяциях протекают разнообразные процессы внутривидовой и латеральной рекомбинации, к этому виду микроорганизмов вполне приложима парадигма пан-генома. Поэтому можно считать, что эпидемический процесс поддерживается циркуляцией среди людей многочисленных независимых клонов возбудителя, обнаружение которых требует использования современных лабораторных методов, что позволит при внутривидовом типировании выявлять в изучаемых популяциях гетерогенность по основной системе генотипа (хромосоме), оценивать идентичные (эпидемические), а также родственные и неродственные кластеры.

Известно, что у MRSA наиболее диверсифицированными и многочисленными являются клональные комплексы CC5 и CC8, которые содержат эпидемические клоны с различными типами SCCmec. В то же время SCCmec типа IV может присутствовать в различных «бэкграундах». Особенно многочисленной является группа ST239 – отдельная ветвь внутри клонального комплекса CC8. Эта группа включает различные эпидемические штаммы и клоны. Именно ST8 и ST239 доминируют в России. Кроме них регистрируют ST228, ST1, ST5, ST22. Их представители отличаются по уровню антибиотикорезистентности.

Следует отметить, что периодически происходит смена эпидемического штамма, доминирующего на отдельных территориях. Согласно данным национального департамента статистики Великобритании их распространение приводит к росту смертности, в частности при бактериемии от 15 до 24 раз.

Характерной чертой многих эпидемических штаммов MRSA является устойчивость практически ко всем известным классам антимикробных препаратов, за исключением гликопептидов и оксазолидинонов. В последние годы участились случаи выделения изолятов, обладающих умеренной чувствительностью и устойчивостью к

ванкомицину. Распространение таких штаммов в стационарах России может иметь драматические последствия.

Перечисленные выше обстоятельства, определили несомненную актуальность представленной к защите диссертационной работы, посвященной внедрению в систему эпидемиологического надзора за стафилококковой инфекцией инновационных подходов к оценке заболеваемости и использованию современных молекулярно-генетических методов.

В ходе комплексного исследования автором были решены задачи по изучению проявлений эпидемического процесса при стафилококковой инфекции, включая распространенность MRS в многопрофильных стационарах, сравнительную оценку методов идентификации и внутривидового типирования. Итогом работы явилась новая стратегия по изучению заболеваемости и мониторингу циркуляции возбудителей с включением оригинальной диагностической тест-системы на основе количественной ПЦР для выявления присутствия нуклеотидных последовательностей MRS в биологическом материале и на объектах внешней среды.

Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность и доказательность полученных результатов диссертационного исследования, обоснованность выводов и рекомендаций подтверждена большим объемом фактических данных: проведен анализ заболеваемости из форм государственной статистической отчетности за 2018 – 2021 гг. (9468 случаев), проанализированы данные, полученные из информационной базы многоцентровых эпидемиологических исследований <https://amrmap.ru/>, изучены биологические материалы от 1215 пациентов и пробы с 430 объектов внешней среды стационаров. Автор принял участие в 100 экспериментах при разработке новой ПЦР-тест системы, осуществил полногеномное секвенирование 35 бактериальных изолятов *Staphylococcus spp.* Исследование проводилось на современной лабораторной базе мирового уровня, в ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора – флагмане отечественной науки в области эпидемиологии и молекулярной биологии.

Сформулированные в диссертации положения, выводы и рекомендации являются логическим обобщением результатов, корректны и полностью соответствуют

поставленным задачам. Практические рекомендации структурированы и имеют адресный характер, нацелены на решение задачи профилактики стафилококковой инфекции, обусловленной метициллинрезистентными штаммами микроорганизмов.

Новизна и теоретическая значимость научных результатов

Диссертантом впервые сформулирован ряд положений, значительно расширяющих понимание теоретических основ эпидемиологии инфекций стафилококковой этиологии. Впервые дана их комплексная оценка, определены уровень в структуре заболеваемости ИСМП на территории Российской Федерации, установлена доля заболеваний с участием MRS.

Уникальным и перспективным для дальнейшего внедрения разделом работы явился анализ данных о заболеваемости на примере стафилококковых инфекций кровотока с использованием информационной базы на постоянно пополняемом и обновляемом онлайн-ресурсе (платформа НИИ антимикробной химиотерапии и Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии <https://amrmap.ru/>) в ходе многоцентровых эпидемиологических исследований. Сравнительная оценка этих данных с результатами, полученными путем изучения официальных форм статистической отчетности позволила выявить существенную разницу в показателях заболеваемости (от 6 до 15 раз). Таким образом, использование предлагаемого подхода может стать новым и весьма эффективным инструментом, позволяющим приблизить показатели заболеваемости к их истинному уровню, следовательно, получить более объективную и достоверную информацию об эпидемическом процессе и его основных детерминантах.

В ходе проведения полногеномного секвенирования MRS, выделенных из отделений реанимации и интенсивной терапии определены 6 ведущих сиквенс-типов *S. aureus* (ST5 (5%), ST7 (5%), ST8 (45%), ST22 (6%), ST30 (10%) и ST5555 (5%)) и 8 spa-типов (t008 (45%), t021 (10%), t091 (5%), t1062 (5%), t12437 (10%), t1544 (5%), t223 (15%), t4573 (5%), при этом преобладающим типом стафилококковой кассеты мес явилась SCCмес-кассета IV типа (75%). Отмечу, что сиквенс-тип ST5555 выявлен впервые в мире. Изоляты MRSE относились к семи различным сиквенс-типам: ST2, ST5, ST22, ST23, ST59, ST87 и ST786.

Полученные результаты существенно дополняют представления о генетической характеристике штаммов стафилококков, циркулирующих в РФ, расширяют возможности изучения особенностей развития эпидемического процесса стафилококковой инфекции. Доказано, что метод полногеномного секвенирования выгодно отличается от других, в том числе MLST по воспроизводимости и разрешающим возможностям.

Разработан новый набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК MRS в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL». Набор позволяет выявлять не менее 400 копий/мл ДНК. Целесообразность использования тест-системы бесспорна, поскольку позволит в ранние сроки прогнозировать изменение эпидемической обстановки, следить за динамикой распространения резистентности стафилококков, получить новые знания, необходимые для разработки и внедрения более эффективных подходов к ее сдерживанию. Доказательством тому является применение разработанного ПЦР-набора в когорте детей, больных муковисцидозом. Шансы встречаемости MRSA в отделяемом ротоглотки в этой группе в 8,6 раз превысили показатели среди здоровых детей.

Таким образом, автором впервые дано научное обоснование новым направлениям совершенствования системы эпидемиологического надзора за стафилококковой инфекцией, обусловленной метициллинрезистентными штаммами стафилококка путем оптимизации информационной подсистемы, а именно эпидемиологического и молекулярно-генетического (микробиологического) мониторинга.

Практическая значимость полученных результатов

Результаты диссертационного исследования бесспорно имеют практический интерес. Использование в системе эпидемиологического мониторинга современных информационных ресурсов (онлайн-платформ), где обобщены данные многоцентровых исследований, проводимых ведущими научно-исследовательскими институтами и профессиональными ассоциациями специалистов может стать тем эффективным инструментом, который позволит госпитальным эпидемиологам повысить достоверность получаемой информации, качественно провести

эпидемиологический анализ ситуации по актуальной инфекции при существенном сокращении временных затрат, в том числе связанных со статистической обработкой.

Включение в систему молекулярно-генетического мониторинга методов быстрой диагностики, в частности нового ПЦР-набора для выявления и количественного определения ДНК MRS среди пациентов и на объектах больничной среды приведет к значительному клиническому и противозидемическому эффекту. Данные об уровне и характере резистентности стафилококков несомненно будут в дальнейшем использованы для прогноза вероятности возникновения и распространения их устойчивости; для информирования Роспотребнадзора и органов здравоохранения о сложившейся эпидемиологической ситуации; для внедрения в работу микробиологических лабораторий стандартных документированных процедур и методов по своевременному и достоверному выявлению резистентности.

Результаты диссертационной работы в части разработки нормативно-методической документации и результатов интеллектуальной деятельности впечатляют. Опубликованы Методические рекомендации, получено регистрационное удостоверение на набор реагентов, зарегистрированы две информационные базы данных, получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Материалы диссертации востребованы и используются на сертификационных циклах обучения, семинарах и практических занятиях для специалистов республик Армения, Белоруссия, Казахстан, Киргизия, Таджикистан и стран-членов АСЕАН.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Автор лично принимал участие в научном исследовании на всех его этапах. Совместно с руководителем четко и лаконично сформулировал цель и задачи, разработал дизайн. Самостоятельно проведена значительная часть эпидемиологических и лабораторных исследований, с коллегами по работе создана оригинальная ПЦР-тест система, выполнена статистическая обработка результатов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора

Работа изложена на 159 листах, включает список сокращений, введение, обзор литературы, главу материалы и методы исследования, пять глав собственных

исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, раздел о перспективах дальнейшей разработки темы, список сокращений и список использованной научной литературы (126 источников). Диссертация иллюстрирована 32 таблицами 25 рисунками. Оформление соответствует стандартам ГОСТ Р 7.0.11. – 2011.

Введение посвящено актуальности изучаемой проблемы, где автор излагает цель и задачи, формулирует научную новизну, определяет практическую значимость, методологию и методы исследования, представляет основные положения, выносимые на защиту, констатирует апробацию результатов и степень их достоверности, указывает сведения об объеме и структуре выполненной работы.

В главе 1 (обзор литературы) обобщены и систематизированы мировые научные знания, накопленные в области эпидемиологии, а также фенотипические и генотипические свойства бактерий рода *Staphylococcus*, включая их видовое разнообразие, факторы патогенности и антибиотикочувствительность, распространенность инфекций с их участием. Глубокая содержательность освещения раздела литературного обзора бесспорна, однако, изложение текста с многочисленными таблицами и рисунками несколько перегружает рукопись.

В главе 2 (материалы и методы) подробно представлены используемые объекты исследования и методы их изучения. Работа носит комплексный и многоэтапный характер, в ней имеют место общенаучные эпидемиологические подходы (ретроспективное описательное эпидемиологическое исследование, исследование «случай-контроль») и современные лабораторные методы (бактериологические, молекулярно-генетические). Методы, в том числе статистического анализа, адекватны для выбранной цели и информативны.

В главах 3-7 (собственные исследования) проводится детальный анализ полученных и проанализированных соискателем материалов об эпидемиологической ситуации по стафилококковой инфекции, охарактеризована динамика и структура заболеваемости, вклад MRS в эпидемический процесс. Проведены сравнительные исследования с оценкой бактериологических и молекулярно-генетических методов обнаружения стафилококков в клиническом материале. Отдельная глава относится к этапам разработки набора реагентов для количественного определения ДНК MRS. Большой и содержательный раздел работы посвящен мониторингу стафилококковых

инфекций в многопрофильных стационарах г. Москвы с использованием разработанного ПЦР-набора, включая обследование пациентов из различных структурных подразделений, с различной патологией, а также объектов внешней среды. Доказана эффективность метода.

Хотелось бы получить более подробные данные по возрастному составу группы обследуемых детей с муковисцедозом. В главе 6 при исследовании отделяемого ротоглотки на носительство *S. aureus* и его метициллинрезистентных вариантов указан только возрастной диапазон от 4 до 18 лет – в группе наблюдения и от 3 до 17 лет – в группе сравнения. На сколько соотносятся полученные данные с результатами исследований, представленных в Клинических рекомендациях – Кистозный фиброз (муковисцидоз) – 2021-2022-2023 (24.09.2021) – Утверждены Минздрава РФ, где наибольшая частота инфицирования *S. aureus* отмечена в возрастной группе от 12 до 16 лет (64,5%). Не совсем понятно включение в данный раздел работы (у детей с муковисцедозом) результатов ПЦР-анализа мазков из ротоглотки на предмет присутствия генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM, карбапенемаз групп KPC и OXA-48, а также БЛРС группы CTX-M (Таблица 32). Известно, что обнаружение перечисленных генов характерно для представителей грамотрицательных видов бактерий. Вероятно, автор использовал мультиплексную панель и решил представить исчерпывающую информацию по результатам этого тестирования.

Обобщающим итогом представленной работы стал разработанный алгоритм мониторинга за циркуляцией MRS среди пациентов и во внешней среде медицинских организаций в плановом порядке и при осложнении эпидемиологической обстановки с включением в комплекс мероприятий молекулярно-биологических методов исследования. Определены категории пациентов, исходя из риска инфицирования. Предложено создать референс-лаборатории для проведения полногеномного секвенирования полирезистентных MRS с целью контроля за распространением актуальных клональных линий. Данный раздел предполагает дальнейшее детальное обсуждение.

В заключении автор обобщает полученные результаты, убедительно доказывая, что эпидемиологический надзор за стафилококковой инфекцией является важнейшей составляющей надзора за ИСМП, который позволяет проводить целенаправленные профилактические мероприятия, направленные на их снижение. Мониторинг за

циркуляцией метициллинрезистентных штаммов на основе молекулярно-генетических методов актуален и востребован, необходим для разработки и внедрения более эффективных подходов к лечению и профилактике ИСМП, сдерживанию появления и распространения устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам, что бесспорно согласуется со "Стратегией предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года", утвержденной Постановлением Правительства Российской Федерации, где определены основные направления решения этой глобальной проблемы.

Выводы, сформулированные в диссертации обоснованы, в целом логично вытекают из содержания, соответствуют ему и поставленным задачам и позволяют считать основную цель работы достигнутой.

Диссертация Т.С. Скачковой представляет собой самостоятельно выполненную научно-квалификационную работу, содержит новые научные положения, решение которых, имеет теоретическую и практическую значимость. Ее научные положения соответствуют паспорту специальности 3.2.2. – Эпидемиология.

Основные результаты представлены автором на многочисленных мероприятиях международного и Российского уровня, опубликованы в 22 научных работах, из которых 4 издания – в рекомендованных ВАК журналах по профилю научной специальности. При проверке работ, их наличие подтверждается в указанных источниках.

Автореферат отражает основное содержание работы и научных публикаций, раскрывает основные положения, выносимые на защиту. Оформление диссертации и автореферата логично, понятно, соответствует требованиям, предъявляемым к подготовке данных видов научно-квалификационных работ.

В варианте рукописи диссертации и автореферате, имеются некоторые неточности, которые не искажают общее положительное представление о работе. Диссертация написана в классическом стиле, хорошим литературным языком, не вызывает принципиальных замечаний.

В ходе изучения рукописи к диссертанту возникли вопросы:

1. Известно, что при определенных состояниях (включая чистку зубов) возможна транзиторная бактериемия, а на поверхности кожных покровов и в полости носа

человека обитает значительное количество представителей рода *Staphylococcus*, составляющих нормофлору этих локусов. Как соотносятся эти данные с результатами Ваших исследований и предложением включить метод ПЦР в протоколы обследования пациентов для доказательства этиологической значимости микроорганизма по обнаружению ДНК в клиническом материале.

2. Можно ли считать доказательством неудовлетворительного санитарно-гигиенического состояния медицинского учреждения обнаружение ДНК MRS на объектах внешней среды, а сами объекты факторами передачи возбудителя инфекции.

3. На каких лабораторных базах, по Вашему мнению, должны быть организованы референс-центры по полногеномному секвенированию стафилококков, каков их предпочтительный статус в системе отраслевых и межведомственных взаимодействий. Экономическая составляющая вопроса.

4. Возможна ли полная элиминация MRSA из человеческой популяции, если да – при каких условиях.

Заключение

Диссертационная работа Скачковой Татьяны Сергеевны «Совершенствование системы эпидемиологического мониторинга за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, на основе молекулярно-биологических методов», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является завершенной научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по совершенствованию эпидемиологического и микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, обусловленными метициллинрезистентными штаммами стафилококка, что имеет существенное значение для эпидемиологии. По своей актуальности, научно-практической значимости, объему выполненных исследований, новизне и ценности полученных результатов и научных положений представленная работа полностью соответствует всем критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335;

02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 №1690), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.2 – Эпидемиология.

Согласна на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России №662 от 01.07.2015г.), необходимых для работы диссертационного совета 64.1.010.01.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, доцент,
заместитель директора Института дезинфектологии
Федерального бюджетного учреждения науки
«Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана»
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека

Захарова Юлия Александровна

Подпись Захаровой Юлии Александровны
«Удостоверяю»:

Ученый секретарь ФБУ
доктор медицинских наук

«Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора

Жукова Валентина Владимировна

«Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Адрес: Российская Федерация, 141014, Московская область, город Мытищи, улица Семашко, дом 2.
Телефон: +7 (495) 586-11-44, Адрес электронной почты: fncg@fncg.ru