

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

члена-корреспондента РАН, д.м.н., доцента Припутневич Татьяны Валерьевны
на диссертацию Вершининой Марины Германовны
«Диагностика сепсиса на основе микробиологических, молекулярно-генетических
и иммунохимических исследований», представленной к защите
в диссертационный совет 04.1.001.01 на базе федерального государственного
бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России
на соискание ученой степени доктора медицинских наук
по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность избранной темы. Сепсис в настоящее время представляет одну из самых актуальных междисциплинарных проблем современной медицины во всем мире, являясь наиболее частой причиной смерти пациентов, госпитализированных в многопрофильные стационары. Неспособность выявить данное заболевание на ранних стадиях задерживает эффективное лечение, что приводит к высокой смертности больных с сепсисом. Максимально быстрая постановка диагноза и своевременно назначенная антибиотикотерапия являются основополагающими мерами для благоприятного исхода таких пациентов. В новых определениях сепсиса указано на инфекционную этиологию его возникновения. Следует отметить, что сепсис проявляется по-разному в зависимости от источника первоначальной инфекции и часто диагностируется уже на поздних стадиях заболевания, когда симптомы становятся очевидными. Современные подходы к изучению сепсиса, как правило, включают в себя рассмотрение особенностей реактивности организма, особенностей его иммунной системы, поиск высокоэффективных средств коррекции выявленных нарушений, назначение правильной антибактериальной терапии. Знания иммунопатофизиологии сепсиса несут информацию о роли клинико-лабораторных параметров в развитии этого тяжелого состояния. Важно оценивать ценность каждого показателя, применяемого для ранней диагностики, мониторинга и прогноза течения этого патологического процесса.

Комплексное использование микробиологических, молекулярно-биологических и иммунохимических методов способно обеспечить не только точную лабораторную диагностику, но и уточнить патогенез заболевания. Разработка новых подходов и совершенствование методов лабораторной диагностики сепсиса гарантируют возможность ранней диагностики, мониторинга и прогноза снижения неблагоприятных исходов в условиях генерализации инфекции.

Разработка стратегии лабораторного мониторинга для верификации и прогнозирования течения септических состояний у больных реанимационных отделений в многопрофильном стационаре на основе микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических исследований, а также создание диагностического клинико-лабораторного алгоритма для ускоренной диагностики, наблюдения и коррекции интенсивной терапии, может способствовать снижению числа неблагоприятных исходов при развитии инфекции. «Золотым стандартом» для диагностики сепсиса в настоящее время считаются микробиологические (культуральные) методы, которые позволяют выявить рост жизнеспособной культуры в питательной среде. Однако использование только этих методов не всегда отражает полную этиологию септического процесса. Кроме того, оснащенность микробиологических лабораторий оборудованием зачастую недостаточна для выполнения исследований на должном уровне. Таким образом, в настоящее время, учитывая разнородность природы септического процесса и недостаточную специфичность клинических проявлений, не существует универсального лабораторного метода для ранней диагностики сепсиса. Разработка новых комплексных подходов и совершенствование методов лабораторной диагностики сепсиса на основе результатов микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических исследований является проблемой современной клинической лабораторной диагностики.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности и востребованности научного исследования, выполненного Вершининой М.Г.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Цель и задачи исследования соответствуют его названию, логично сформулированы и полностью раскрыты в диссертационной работе. Четко сформулированные научные положения и выводы, представленные в работе, подкреплены результатами исследований и отражают суть диссертации. В ходе выполнения диссертационной работы М.Г. Вершининой был разработан алгоритм комплексной клинико-лабораторной диагностики сепсиса и тяжелых инфекций для пациентов, поступающих в отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) и находящихся в группе риска по развитию септических осложнений.

Работа проведена с использованием лабораторных и клинических данных 2274 пациентов и 7428 образцов биологического материала пациентов, поступивших в реанимационные отделения многопрофильного стационара с подозрением на сепсис и тяжелые инфекции, из них биологический материал, полученный от 1116 больных, анализировался при оценке микробного пейзажа многопрофильного стационара для выявления приоритетных патогенов сепсиса и синдрома системной воспалительной реакции (ССВР). В работе использованы современные микробиологические, молекулярно-генетические и иммунохимические методы диагностики. Полученные данные позволяют утверждать, что работа проведена на высоком уровне.

Следует отметить личное участие автора на всех этапах работы (планирование научной работы, постановка цели и задач, разработка методических подходов и их выполнения, выбор лабораторных маркеров и статистических методов, проведение лабораторных исследований, анализ клинических и лабораторных данных, их систематизация и обобщение, статистическая обработка, описание полученных результатов). Практические рекомендации изложены четко и могут служить руководством для врачей-специалистов, назначающих лабораторное обследование пациентам с факторами риска развития бактериальной инфекции, органной дисфункции и септических состояний.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, многократно обсуждены на российских и международных научных конференциях, конгрессах и семинарах. Основные результаты исследования опубликованы в 46 печатных работах, из них 16 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертационных работ, а также индексируемых в базах Web of Science и Scopus, изданы учебное и учебно-методическое пособие, рекомендованные ФГБУ «ЦГМА» Управления делами Президента Российской Федерации в качестве учебных пособий для системы последиplomного образования врачей специалистов.

Научная новизна исследования и достоверность полученных результатов. Достоверность данных, представленных в диссертационной работе, подтверждается оценкой результатов обследования, полученных с использованием современных методов лабораторной диагностики и сертифицированных тест-систем для микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических исследований, а также применением современных компьютерных программ для статистического анализа данных. Результаты, полученные Вершининой М.Г., воспроизводимы и не противоречат данным, представленным в независимых источниках зарубежными авторами, что подтверждает корректность сделанных в ходе работы выводов.

Данное исследование, несомненно, имеет научную новизну. Разработан алгоритм клинико-лабораторной диагностики сепсиса и ССВР, обоснованы принципиально новые подходы к использованию лабораторных методов для своевременной диагностики, мониторинга, коррекции интенсивной терапии, а, следовательно, для улучшения результатов лечения пациентов ОРИТ. Проведен сравнительный анализ полученных результатов микробиологических и молекулярно-генетических исследований у пациентов реанимационных отделений, детально изучены возможности метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления патогенов при сепсисе и ССВР, определено клиническое значение применения молекулярно-биологических методов для поиска инфекционных агентов при септических

состояниях. Получены новые данные о значимости лабораторного маркера пресепсин при его использовании для прогноза неблагоприятного исхода. В исследовании впервые с использованием современного лабораторного оборудования представлены данные по пороговым значениям биомаркеров, которые могут быть использованы при стратификации пациентов с инфекцией госпитализированных в ОРИТ. Предложен комплексный клинико-лабораторный анализ различных микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических лабораторных маркеров.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы. На основе комплексного клинико-лабораторного анализа продемонстрирована высокая диагностическая значимость микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических методов лабораторного исследования, используемых при оценке неотложных критических состояний, ассоциированных с риском развития ССВР и сепсиса. С привлечением данных литературы и результатов работы предложены и обоснованы протоколы клинико-лабораторного обследования пациентов, поступающих в ОРИТ. Предложено комплексное использование ПЦР в режиме реального времени со стандартными микробиологическими (культуральными) исследованиями для повышения эффективности выявления клинически значимых патогенов. Рекомендуется ввести в клиническую практику расчеты клиренсов лабораторных маркеров PCT и MR-proADM с оценкой в динамике, что повысит диагностическую ценность данных маркеров, а также позволит определять развитие у пациентов неблагоприятного исхода. Предложено использовать в клинической практике оптимальные комбинации диагностических и прогностических лабораторных маркеров (прокальцитонина, MR-проадренomedулина, пресепсина и абсолютного числа лейкоцитов). Анализ этих параметров поможет врачу корректно оценить состояние пациента не только на основании анамнеза и физикального обследования, но и с привлечением данных лабораторного тестирования.

Определенные автором значения AUC ROC с определением площади под характеристической кривой, чувствительности и специфичности

концентрации лабораторных маркеров, разработанная диагностическая панель для ускоренной идентификации возбудителей инфекций кровотока и нозокомиальной пневмонии методом ПЦР в режиме реального времени с использованием результатов анализа микробного пейзажа в ОРИТ, разработанный в исследовании М.Г.Вершининой алгоритм ранней диагностики сепсиса и ССВР у пациентов, госпитализированных в реанимационные отделения многопрофильного стационара, позволяют использовать информативные и клинически значимые лабораторные тесты в клиничко-диагностических и микробиологических лабораториях медицинских организаций. В настоящее время результаты работы автора уже используются в практической и учебной деятельности ряда учреждений нашей страны.

Общая характеристика работы. Диссертация написана по традиционному плану, изложена на 289 страницах машинописного текста и включает 51 таблицу, 34 рисунка и 4 приложения. Работа состоит из введения, 4 глав (обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», главы с результатами собственных исследований и главы «Обсуждение полученных результатов исследования»), выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. В библиографическом указателе приведены 412 источников (43 отечественных и 369 зарубежных публикации).

Введение отражает актуальность и степень разработанности темы диссертационного исследования. В этом разделе сформулированы цель и задачи работы, показаны научная новизна и практическая значимость, определен личный вклад соискателя, приведены положения, выносимые на защиту, а также степень достоверности и апробации результатов. Целью исследования является обоснование и разработка алгоритма для верификации и прогнозирования течения септических состояний у больных ОРИТ в многопрофильном стационаре на основе комплексного анализа различных микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических биомаркеров у пациентов с сепсисом. Для достижения данной цели корректно сформулировано 5 задач. На основании введения можно

заклучить о соответствии диссертационной работы специальности «Клиническая лабораторная диагностика».

В обзоре литературы на основании анализа отечественных и зарубежных источников автором охарактеризована значимость лабораторных исследований в современных условиях, дана исчерпывающая характеристика микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических лабораторных методов. Существенное внимание уделено этиологической структуре инфекций и факторам риска развития бактериального сепсиса, дана характеристика основным, доступным к измерению лабораторным маркерам. Всесторонний анализ изучаемого вопроса позволил сформулировать цель и задачи исследования, а также определить подходы к их решению. Обзор написан литературным языком и свидетельствует о свободном владении материалом.

Глава «Материалы и методы» обширна, в ней подробно описаны лабораторные методы, использованные в работе, дана характеристика группам обследованных лиц – пациентам с различными нозологиями и группам сравнения, представлены: подробный план диссертационного исследования, характеристика исследуемого биологического материала, различные методы лабораторного анализа с указанием используемого оборудования, а также приведены сведения об объеме выполненных исследований и использованных методах. Описаны статистические методы, которые были применены для обработки полученных результатов с помощью программного обеспечения, включая корреляционный и ROC-анализ.

В третьей главе приведены непосредственно результаты диссертационного исследования соискателя. Глава начинается с анализа микробного пейзажа отделений многопрофильного стационара, включая результаты исследования микроорганизмов, принадлежащих к группе ESKAPE. Автором проведен анализ результатов гемокультивирования для выявления инфекционных агентов с использованием микробиологических и молекулярно-генетических лабораторных методов. Для ускоренной диагностики сепсиса и ССВР разработана комбинированная диагностическая панель определения ДНК возбудителей септических инфекций и генов

резистентности к антибиотикам, основанная на использовании молекулярно-генетических методов с учетом данных микробного пейзажа ОРИТ, полученных ранее. В данной главе большое внимание уделяется исследованиям лабораторных маркеров для диагностики и мониторинга септических состояний. Описаны возможности использования лабораторных тестов при развитии септических осложнений.

Автором диссертационного исследования показана диагностическая и прогностическая значимость лабораторных маркеров, определены оптимальные пороговые значения для каждого изученного биомаркера. Существенное внимание уделено целесообразности использования лабораторных маркеров сепсиса, ССВР и полиорганной недостаточности для оценки прогноза неблагоприятного исхода. Определены коэффициенты диагностической чувствительности и специфичности изученных лабораторных тестов, определены значения AUC ROC. Убедительно продемонстрирована возможность использования разработанного автором алгоритма комплексной клинико-лабораторной диагностики сепсиса и тяжелых инфекций для пациентов, поступающих в ОРИТ, с использованием комбинаций лабораторных маркеров, подобранных на основании пороговых значений, определенных с применением AUC ROC. Большое внимание уделено демонстрации диагностической значимости разработанных моделей биомаркеров с детальным изучением их характеристик. Показатели чувствительности и специфичности разработанных моделей комбинаций лабораторных маркеров превосходят параметры данных характеристик при обособленном использовании изученных биомаркеров.

При обсуждении полученных данных в главе 4 «Обсуждение полученных результатов исследования» автор подробно анализирует полученные результаты, раскрывая возможности их интерпретации и подчеркивая клинико-диагностическую значимость разработанного алгоритма комплексной клинико-лабораторной диагностики сепсиса и тяжелых инфекций для пациентов, поступающих в ОРИТ, находящихся в группе риска по развитию септических осложнений.

Работа заканчивается 6 выводами и 5 практическими рекомендациями, логично вытекающими из основных материалов диссертации. Выводы отражают новизну, теоретическую и практическую значимость проведенных исследований. Все выводы диссертации логично вытекают из глубокого анализа и обобщения результатов исследования и поэтому не вызывают сомнений.

Замечания к работе. Работа написана хорошим литературным языком. Рукопись хорошо оформлена. Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению диссертации нет. Автореферат и опубликованные статьи полностью отражают материалы диссертации.

В работе названия микроорганизмов приведены в некоторых случаях в полном виде, а в других случаях – в сокращенном виде, нет расшифровки ряда аббревиатур и некоторые не указаны в списке сокращений, что не снижает научной ценности работы.

Имеются некоторые замечания:

1. Возможно, было бы корректнее в таблице 21 с разработанной тест-панелью на основе ПЦР в режиме реального времени, отнести гены KPC и OXA-48 к группе «сериновые протеазы», а не к группе «карбапенемазы», так как карбапенемазами являются и ферменты групп VIM, NDM, IMP, обозначенные как «металло-бета-лактамазы».

2. Из Таблицы 21 следует, что кодируемые белки VanA/VanB являются модифицированным дипептидом D-Ala-D-Lac, однако это не совсем корректно: эти белки – не дипептиды, а ферменты, которые осуществляют синтез дипептида.

В качестве дискуссии хотелось бы узнать мнение автора:

1. С чем, по мнению автора, связаны сниженные показатели встречаемости граммотрицательных возбудителей (особенно *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*) в ОРИТ по сравнению со статистическими данными регионального уровня?

2. Интересно было бы узнать, использовался ли для видовой идентификации микроорганизмов при проведении микробиологических

исследований метод MALDI-TOF масс-спектрометрии? В главе с методами исследования нет соответствующей информации.

Заключение. Диссертация М.Г. Вершининой на тему «Диагностика сепсиса на основе микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических исследований», представленная к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, является законченной научно-квалификационной работой. В ней на основании выполненных исследований решена актуальная научная проблема, имеющая важное значение для современной медицины, главным образом, клинической лабораторной диагностики – доказана диагностическая значимость комплексного использования лабораторных методов, а именно микробиологических, молекулярно-генетических и иммунохимических, для своевременной диагностики и прогноза исхода сепсиса и синдрома системной воспалительной реакции при лабораторном обследовании пациентов, госпитализированных в отделения реанимации и интенсивной терапии с подозрением на бактериальную инфекцию и развитие септических осложнений. В работе продемонстрированы преимущества совместного использования методов полимеразной цепной реакции и культурального исследования с предварительной оценкой микробного пейзажа для выявления значимых патогенов. Внедрение разработанных моделей комбинаций лабораторных маркеров с предложенной балльной оценкой каждого биомаркера для получения корректных результатов анализа позволяет значительно усовершенствовать раннюю диагностику сепсиса и синдрома системной воспалительной реакции, что, в свою очередь, будет способствовать улучшению терапии. В диссертации изложены новые, имеющие принципиальное значение подходы к лабораторной диагностике септических состояний.

Диссертация по своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, практической и теоретической значимости, достоверности и обоснованности результатов соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного

