

ВІДГУК

завідувача лабораторно-експериментальним відділом ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», доктора медичних наук, Джораєвої Світлани Кар'ягдівни на дисертаційну роботу Кхедера Саїда Салеха «Удосконалення методів бактеріологічної діагностики захворювань, обумовлених токсинпродукуючими штамми *C. difficile*», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

Актуальність теми дисертаційної роботи

C. difficile (CD) є однією з провідних причин внутрішньолікарняної кишкової інфекції, яка збільшує тривалість госпіталізації, ускладнює перебіг основного захворювання та може стати причиною смерті пацієнта. Клінічні прояви CD інфекції різноманітні: від безсимптомного носійства, легкої діареї до важких форм псевдомембранозного коліту з утворенням фібринозних бляшок на слизовій оболонці кишки. CD інфекцію слід розглядати як внутрішньолікарняну та опортуністичну інфекцію, головними факторами ризику розвитку якої є прийом антибактеріальних препаратів та хірургічне втручання на органах травлення. Також розвитку CD інфекції сприяє вживання деяких лікарських засобів, здатних порушувати мікробіоту кишечника (протипухлинні, протитуберкульозні та ін.), а також прийом інгібіторів протонної помпи та/або антагоністів H₂-гістамінових рецепторів, НПЗП. Крім того, до групи ризику відносять осіб з різними хронічними хворобами, а також людей похилого віку. Процес встановлення реальних показників захворюваності та соціально економічних витрат достатньо складний та залежить від багатьох факторів: наявності відповідної нормативної документації, частоти тестування, використання різних схем та методів обстеження та інше.

Одним з найважливіших досягнень вивчення проблеми захворюваності, обумовленої збудником *C. difficile*, було виявлення високо вірулентних

риботипів штамів, які призводять до підвищеної захворюваності та смертності і досить часто такі захворювання не пов'язані безпосередньо з прийомом антибіотиків. Це стало підґрунтям для введення нового поняття «*community associated C. difficile-infection*», тобто інфекція, поширена в суспільстві. Таке формулювання підкреслює той факт, що *C. difficile*-інфекція (CDI) залишається актуальною проблемою системи охорони здоров'я в усьому світі в зв'язку з поширеністю та значними економічними витратами. На відміну від США, Канади, країн ЄС та розвинених країн Азії в Україні поки що не введена обов'язкова реєстрація цих захворювань. Загальна картина захворюваності відсутня, тому що більшість стаціонарів діагностику та реєстрацію випадків CDI не проводять. Відомо лише про вибірккові дослідження стану захворюваності в окремих медичних закладах. Це пов'язано з недостатністю в нашій країні необхідної нормативно-технічної документації, спеціально обладнаних лабораторій, вітчизняних тест-систем та живильних середовищ.

Актуальність даних досліджень обумовили мету дисертаційної роботи: підвищення ефективності лабораторної діагностики ентероколітів, обумовлених *C. difficile*, шляхом удосконалення бактеріологічних методів виділення збудника та методів встановлення його токсинпродукуючих властивостей.

Дисертаційна робота була виконана у лабораторії анаеробних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» і є фрагментом науково-дослідної роботи «Удосконалення бактеріологічних методів виділення токсигенних штамів *C. difficile*», (№ Державної реєстрації 0117U002282).

Завершеність дисертаційного дослідження

Для досягнення поставленої мети, дисертантом були визначені завдання дисертаційного дослідження, що включали удосконалення схеми бактеріологічного виділення *C. difficile* з клінічного матеріалу, проведення бактеріологічного обстеження хворих з проявами CDI зі встановленням змін

видового та кількісного складу мікробних асоціацій кишечника у хворих з підозрою на CDI, визначення біологічних властивості клінічних ізолятів *C. difficile* та розробку нових бактеріологічних методів виділення збудника з патологічного матеріалу та виявлення його токсинпродукуючих властивостей.

Як свідчать матеріали дисертації, здобувачем виконано всі поставлені завдання з системним аналізом тематичної наукової літератури і профільної медичної документації, використанням сучасних і адекватних, поставленим завданням, методів досліджень (інформаційно-аналітичних, біологічних, бактеріологічних та математико-статистичних), достатнім обсягом проведених експериментів та повноцінною статистичною обробкою їх результатів.

Вперше в Україні розроблено та запатентовано склад нового середовища для культивування *C. difficile*, яке має високі ростові якості та селективну дію у порівнянні з аналогами та, за рахунок оптимальної прозорості та щільності, придатне для детекції токсинів у реакції специфічної імунопреципітації з антитоксином. Удосконалено схему бактеріологічної діагностики CDI, яка дозволяє виділяти токсиноутворюючі штами *C. difficile*, що дозволяє виявляти токсинпродукуючі штами та забезпечує достатньо високий рівень чутливості культурального методу (10^3 - 10^4 КУО *C. difficile* в 1 г фекалій), специфічності 100 % та відтворюваності результатів досліджень > 95 %. Схема включає найбільш ефективні середовища для відбору та збереження біоматеріалу, накопичення та виділення чистої культури збудника, встановлення продукції токсинів.

Доповнено дані щодо змін мікробіоти кишечника у хворих з CDI. При обстеженні хворих з діареєю та підозрою на CDI, збудник *C. difficile* було виділено у 9,7 % обстежених. Характер порушень мікрофлори в обох групах (з підтвердженою та не підтвердженою CDI) відповідав 2-му та 3-му ступеням тяжкості дисбіозу.

Встановлено, що виділені клінічні штами *C. difficile* зберігають високу чутливість до препаратів вибору – метронідазолу та ванкоміцину, що

дозволяє і надалі вважати їх препаратами першої лінії для етіотропного лікування CDI, враховуючи ступінь ризику рецидивуючого перебігу хвороби.

Досліджено токсинпродукуючі властивості виділених клінічних ізолятів та порівняно їх з музейними штамами *C. difficile*. За допомогою біологічної проби на білих мишах визначено, що виділені клінічні ізоляти (n=7) не продукували токсини, що дозволило попередньо вважати їх такими, які не мають епідемічного значення.

Структура дисертації та загальна характеристика роботи

Дисертаційна робота написана за загальноприйнятим для таких робіт планом, викладена на 131 сторінці машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень з аналізом та узагальненням результатів, висновків, практичних рекомендацій та 4 додатків. Робота містить 15 таблиць і 7 рисунків. Список використаних джерел складається зі 135 робіт кирилицею та латиницею.

В огляді літератури автор на основі ознайомлення з літературними джерелами дає оцінку стану поширюваності хвороб, пов'язаних з CDI, в різних країнах світу. Доводить актуальність цієї проблеми, її соціально-економічну значимість. Детально знайомить з особливостями мікроорганізма – збудника, описує виявлені в останні роки еволюційні зміни, що стосуються його вірулентності. Проводить аналіз сучасного стану лабораторної діагностики, особливо акцентуючи увагу на бактеріологічних методах та перешкодах, що заважають впровадженню цих методів в широку лабораторну практику.

У розділі 2 описані матеріали і методи досліджень. Автор детально описує всі використані методи досліджень, як ті, що стосуються бактеріологічного обстеження хворих, виділення та детального вивчення мікроорганізма – збудника, отримання специфічних антигенів, гіперімунної сироватки, методику постановки реакції специфічної імунопреципітації, так і на способі розробки нового селективного середовища та схеми обстеження хворих.

Розділ 3 присвячено порівняльному вивченню різних бактеріологічних схем виділення *C. difficile* з клінічного матеріалу та ідентифікації виділених штамів. Дисертант проводить дослідження щодо удосконалення відомої схеми бактеріологічного виділення клостридій з клінічного матеріалу, обґрунтовує доцільність використання деяких транспортних та живильних середовищ, доводить більш високу чутливість запропонованої схеми виділення збудника, а також той факт, що використання розробленого нового селективного середовища дозволяє виявляти токсин продукуючі штами збудника.

У розділі 4 описані дослідження, щодо характеристики складу мікрофлори кишечника у обстежених хворих з діареєю. При обстеженні 73 пацієнтів з діареєю та підозрою на CDI виявлено, що у всіх хворих відмічались кількісні та якісні порушення складу мікрофлори кишечника. Характер порушень мікрофлори в усіх хворих (у групі з виявленою *C. difficile* та у групі, де збудник не виділявся) відповідав 2-му та 3-му ступеням тяжкості дисбіозу, що виявлялося у зниженні кількості *E.coli* з нормальною ферментативною активністю у 10 і більше разів, зниженні кількості інших представників нормобіоценозу, а саме *Bifidobacterium* spp. та *Lactobacillus* spp. у 10 і більше разів, підвищенні кількості мікроорганізмів роду *Enterococcus* та *Staphylococcus* у всіх пробах, що і обумовило перевагу кокових форм у загальній кількості мікробів майже в 3 рази порівняно з нормопоказником. Крім того, характерною ознакою порушень мікрофлори кишечника, у пацієнтів з визначеною *C. difficile*, було статистично достовірне підвищення кількості грибів роду *Candida*.

У розділі 5 описано антибіотикочутливість та токсинпродукуючі властивості виділених штамів *C. difficile*. За результатами проведених досліджень встановлено, що всі перевірені клінічні штами *C. difficile* за показниками МІК згідно з «Методикою визначення та оцінки чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів» рекомендовану EUCAST (2020), зберігали чутливість до ванкоміцину та метронідазолу. Перевірка культуральних фільтратів клінічних ізолятів *C. difficile* засвідчила, що вони не містили

токсинів та не виявляли летальної дії, що дало можливість попередньо вважати їх такими, що не мають епідемічного значення.

Значний обсяг досліджень описано у **розділі 6**. У цьому розділі експериментальних досліджень автор описав низку поведених досліджень, які присвячені покращенню ростових якостей середовища, що розроблялось. Проведено експериментальним шляхом порівняння відомих селективних середовищ для виділення мікроорганізмів *C. difficile*, що виробляються фірмами різних країн (Індії, США, Канади). Шляхом удосконалення складу відомих середовищ, автором отримано нове селективне середовище, придатне для виявлення токсинів в реакції специфічної імунопреципітації з антитоксином.

Зауваження, пропозиції та запитання до змісту дисертаційної роботи

Під час рецензування матеріалів дисертаційної роботи автору були зроблені певні зауваження щодо оформлення фактичного матеріалу (таблиці, рисунки та інше), які представлені вище по розділах, які було усунуто у процесі роботи над дисертаційним дослідженням. Ці зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

У порядку наукової дискусії бажано одержати відповіді на наступні запитання:

Запитання до дискусії:

1. За якими критеріями Ви обирали референс-штами для контролю селективних властивостей комерційних середовищ?
2. Які переваги та недоліки має запропонований Вами метод виділення *C. difficile* у порівнянні з молекулярно-генетичними методами дослідження?
3. На Вашу думку які діагностичні методи можуть бути використані у якості контролю ефективності проведення етіотропної терапії *C. difficile*-інфекції та післятерапевтичної ерадикації збудника?

Відповідність напрямку досліджень і змісту дисертації галузі науки, формулі спеціальності та профілю спеціалізованої вченої ради

За напрямком досліджень і змістом дисертаційна робота Кхедера Саїда Салеха «Удосконалення методів бактеріологічної діагностики захворювань, обумовлених токсинпродукуючими штамами *C.difficile*», відповідає галузі науки – охорона здоров'я, паспорту (формулі) спеціальності медицина, 03.00.07 – мікробіологія та профілю спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України».

Повнота висвітлення результатів дисертаційного дослідження в опублікованих працях (наукових фахових виданнях) та авторефераті.

За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць (2 одноосібно): 5 статей (4 – у фахових виданнях України, 1 – у міжнародному виданні, 5 включено до наукометричних баз), 1 патент на корисну модель, 1 технологія та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій та з'їздів. Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи неодноразово доповідалися й обговорювалися на багатьох науково-практичних конференціях, з'їздах, конгресах, семінарах, в тому числі й з міжнародною участю. Вказане вище, дозволяє визначити, що опубліковані праці в повній мірі розкривають основні наукові положення, висновки і практичні рекомендації дисертаційної роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Кхедера Саїда Салеха «Удосконалення методів бактеріологічної діагностики захворювань, обумовлених токсинпродукуючими штамами *C.difficile*» – є самостійною завершеною науковою працею, яка містить теоретичне узагальнення та вирішення науково-практичної задачі, що полягає в оптимізації підходів до бактеріологічної діагностики захворювань, обумовлених токсинпродукуючими штамами *C. difficile*, на підставі удосконаленої схеми

бактеріологічного виділення збудника та нового селективного середовища для визначення токсинпродукуючих штамів *C. difficile*.

Дисертаційна робота Кхедера Саїда Салеха за обсягом проведених досліджень, інформативністю використаних методів, актуальністю та методичним рівнем, науковою новизною, теоретичною та практичною значимістю цілком відповідає вимогам щодо кандидатських дисертацій, які визначені в п.п. 11-13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 із змінами та у наказі МОН України №40 від 12.01.2017р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07.-мікробіологія.

Завідувач лабораторно-експериментальним
відділом ДУ «Інститут дерматології
та венерології Національної академії
медичних наук України»,
доктор медичних наук,

С.К.Джораєва

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
"ІНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГІЇ ТА ВЕНЕРОЛОГІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"
З ОРИГІНАЛОМ ЗГІДНО
исп. кадрів *Сур*
(посадка) (підпис)
Коротцька 20

