

## О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук Кафтыревой Лидии Алексеевны на диссертационную работу Арутюняна Александра Артемовича «Мониторинг распространенности генов резистентности к антибиотикам у больных хроническим пародонтитом», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 1.5.11 – микробиология (медицинские науки) и 3.1.7. – стоматология (медицинские науки).

### Актуальность исследования

Диссертация Арутюняна Александра Артемовича посвящена важной проблеме медицинской микробиологии и стоматологии – выявлению генетических механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам и поиску путей их преодоления при лечении патологии полости рта. ВОЗ назвала проблему устойчивости к антимикробным препаратам одной из 10 стоящих перед человечеством глобальных угроз здоровью населения. Учитывая, что хронический пародонтит по широте распространённости среди населения, безусловно, является проблемой мирового масштаба, а врачи-стоматологи в процессе лечения этой патологии используют антимикробные препараты, можно заключить, что цель работы диссертанта – обоснование рационального применения антибактериальной химиотерапии в пародонтологии с учётом выявленных генетических маркеров резистентности к антибиотикам при проведении различных схем пародонтологического лечения, несомненно, представляет актуальность, теоретическую практическую значимость.

Диссертант изучал не конкретный микроорганизм, а «микробиоту» пародонта (совокупность различных микроорганизмов, заселяющих экологические ниши организма человека). Микробиоту в настоящее время приравнивают к «новому», самостоятельному органу, связанную функционально с другими системами и играющую большую роль в поддержании гомеостаза организма человека. Например, микробиота кишечника — это отдельная функционирующая система организма. В связи с выше сказанным, рецензируемая работа, в которой на основании результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов исследования, проводятся различные схемы

пародонтологического лечения, несомненно, представляет актуальность, большую теоретическую и практическую значимость. В настоящее время осуществление подобного исследования микробиологического наблюдения (мониторинга) классическим бактериологическим методом в практических лабораториях затруднено из-за трудоёмкости традиционного культурального (бактериологического) метода исследования, его длительности (при анаэробной инфекции челюстно-лицевой области до 10-14 суток и более). Используемые в настоящее время методы лабораторной диагностики не позволяют достоверно проводить детекцию многих видов аэробных и анаэробных микроорганизмов, в том числе, вызывающих заболевания пародонта, а также определять количество и соотношение возбудителей разных видов в очаге гнойного воспаления.

Даже такие перспективные масс-спектрометрические технологии, которые в настоящее время доступны бактериологическим лабораториям (масс-спектрометрическое исследование таксономической идентификации микроорганизмов III—IV групп патогенности), а именно, времяпролетная масс-спектрометрия или MALDI-TOF MS, основаны на идентификации «чистых культур микроорганизмов» и не могут решить поставленные диссертантом задачи в диссертационной работе. Важность нерешённых вопросов в области противодействия растущей резистентности к антимикробным препаратам возбудителей инфекционных заболеваний подчёркивается документами и нормативными актами на уровне Правительства Российской Федерации, Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения Российской Федерации, ВОЗ, принятыми в последние годы. Для современной клинической и амбулаторной стоматологической практики проблема резистентности к антибиотикам микроорганизмов стоит особенно остро, так как нет достаточно убедительных и полноценных исследований в этом направлении.

**Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций,  
сформулированных в диссертации**

Учитывая важность оценки профиля резистентности патогенной микробиоты полости рта к антимикробным препаратам в терапии пародонтита,

требуется изучение рациональных подходов к решению этой проблемы. В качестве возможного решения автор предлагает использовать молекулярно-биологический метод исследования, позволяющий с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) выявлять гены резистентности /генетический профиль резистентности к антибиотикам у конкретного пациента, что в последнее время получило широкое распространение для анализа микробиоты осложнённых гнойных процессов хирургических операций при заболеваниях желудочно-кишечного и урогенитального тракта в отделениях реанимации и интенсивной терапии и др. ПЦР позволяет достаточно быстро и достоверно определять гены резистентности, (составить генетический профиль резистентности микробиоты конкретного пациента), что позволяет эффективно следить за изменением резистентности к антибиотикам на уровне бактериальных популяций, что представлено в диссертации А.А. Арутюняна.

Автором впервые получены и систематизированы сравнительные данные мониторинга устойчивости к антибиотикам резидентных и «пародонтопатогенных» видов микроорганизмов (микробиоты) полости рта, включая используемые в настоящей работе для лечения пациентов антибиотики (амоксциллин/клавуланат натрия; доксициклин, форма «Солютаб»). Впервые, по данным молекулярно-генетических исследований, выявлены группы генов, кодирующие резистентность представителей микробиоты полости рта к антибиотикам *in vitro* (Bla DNA гены – к пенициллинам; CTX-M и Mec A гены – к цефалоспорином 1 и 3 поколения; Erm B и Mef гены – к макролидам, линкосамидам и стрептограминам; Van A, B гены – к гликопептидам; Tet M и Q гены – к тетрациклинам, включая плазмиды и интегроны).

После проведения предварительной идентификации штаммов, выделенных при культуральном исследовании, осуществляли молекулярно-генетическое исследование в RT-PCR, используя праймеры для детекции соответствующих генов резистентности и референс-штаммы для контроля. В частности, для выявления устойчивых к тетрациклину штаммов в качестве референс-штаммов

использовали штаммы основных видов парадонтопатогенных бактерий I порядка: *A. actinomycetemcomitans* серотип b tox+ ATCC 29523, *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. forsythia* ATCC 43037 а также референс-штаммы парадонтопатогенных видов II порядка и представителей резидентной микробиоты.

В экспериментальной части исследования с использованием оригинальной методики программируемого культивирования микроорганизмов *in vitro* с построением кривых роста и цифровой регистрацией результатов проведена оценка клинического изолята *Streptococcus intermedius* с добавлением образцов сыворотки крови пациентов из групп, принимавших антибактериальные препараты «Амоксициллин/клавуланат» и «Доксициклин/соллютаб» соответственно. Отмечено, что доксициклин/соллютаб вызывал пролонгацию фазы адаптации и снижение амплитуды стационарной фазы в минимальных концентрациях. Таким образом, можно констатировать, что в исследовании уточнены особенности антимикробного действия препаратов, обусловленные фармакодинамикой в процессе системного лечения генерализованного пародонтита.

Полученные автором результаты исследований, проведённых *in vitro* и *in vivo*, корректная статистическая обработка позволили сделать обоснованные выводы: с микробиологических позиций обосновать показания для проведения детекции генов резистентности к антибиотикам в клинических изолятах, выделенных у этих пациентов.

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

Диссертантом получена база данных среднего «резистома» для популяции возбудителей Московского региона Российской Федерации, которая характеризуется относительно высоким уровнем выявления генов резистентности CTX-M, bla DNA и Erm патогенной части микробиоты полости рта и более низким уровнем генов Tet M и Tet Q (до 8,8 %).

Диссертантом разработан и предложен алгоритм этиологической диагностики пародонтита, основанный на применении молекулярных методов исследований и оценки комплекса генов резистентности к антибиотикам.

Усовершенствованы показания для проведения антибактериальной терапии у пациентов с пародонтитом в фазе обострения и ремиссии на основании полученных данных о механизмах резистентности патогенных представителей микробиоты полости рта к антибактериальным препаратам с помощью молекулярно-генетического метода исследования (ПЦР).

Обоснован и апробирован алгоритм рациональной антибактериальной химиотерапии при проведении пародонтологического лечения пациентов (в сравнительных исследованиях).

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

Обоснованность и достоверность результатов диссертационного исследования определяется использованием современных клинико-лабораторных подходов к решению поставленных задач и, достаточного материала с использованием современных методов определения генов резистентности к антимикробным препаратам *in vitro* и *in vivo* бактерий, составляющих микробиоты полости рта при хроническом пародонтите, что подтверждается достаточным объемом полученных экспериментальных и клинических данных по определению стоматологического статуса, результатами молекулярно-генетических и микробиологических исследований; корректной статистической обработкой результатов исследований и наблюдений.

Диссертационное исследование оформлено по традиционному плану, включает введение, главу обзор литературы, материалы и методы, две главы результатов собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы и практические рекомендации.

Во **введении** автор обосновывает актуальность проведенного исследования, формулирует цель - обоснование рационального применения антибактериальной терапии в пародонтологии с учётом выявленных генов резистентности к антибиотикам микробиоты пародонта, необходимости мониторинга результатов исследований, полученных на основании фенотипических и генетических методов исследования при проведении различных схем пародонтологического лечения, диссертант обосновывает пути решения,

определяет задачи, методологию и методы исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, степень достоверности результатов, сведения о апробации результатов, а также личное участие автора в получении результатов.

В «Обзоре литературы» (глава 1) представлены современные представления об особенностях этиологии пародонтита с разделением возбудителей на патогенные виды условно I и II порядка, анализирует данные литературы о значении удаления поддесневой микробной биопленки при лечении воспалительных заболеваний пародонта и о роли терапии антимикробными средствами в фазе обострения и ремиссии заболевания, когда бактерии локализованы внутриклеточно и необходимы особые подходы к терапии. Достаточно полно и подробно проанализированы данные литературы о механизмах и генах резистентности к антимикробным препаратам. Отечественные и зарубежные источники литературы отражают как классические фундаментальные работы, так и современные за последние 5-10 лет, что подтверждает актуальность проведенного исследования.

Во второй главе диссертации «Материалы и методы исследования» описан дизайн исследования, представлены результаты изучения стоматологического статуса 123 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Подробно описаны методики проведения бактериологического исследования (культивирования проб биоматериала в анаэробных условиях), программируемого культивирования микробных популяций, молекулярно-генетического исследования (ПЦР в реальном времени). Приведены методики удаления поддесневой микробной биопленки и применения антибиотиков для лечения (амоксциллин/клавуланат натрия и доксициклин/солютаб), а также методы статистической обработки материала.

В соответствии с поставленными целью и задачами, автором выбраны адекватные современные методы лабораторных исследований, позволившие получить достоверные данные: микробиологические, молекулярно-биологические, клинические и статистические.

Диссертантом чётко сформулированы критерии включения, не включения и исключения пациентов в исследование, проведено обследование 153 пациентов и сформированы 3 группы сравнения. Итоговое число участников исследования составило 123 человека. Дизайн исследования отражает два основных направления, которые тесно взаимосвязаны – экспериментальное и клинико-лабораторное.

**В главе 3** приведены результаты молекулярно-генетического исследования проб биоматериала у разных групп пациентов. Отбор клинических изолятов микробиоты осуществляли в 3-х группах:

1- пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом в стадии обострения (ХПО), обратившиеся к врачу-стоматологу для проведения соответствующего пародонтологического лечения. В дальнейшем эта группа была разделена на 3 клинически значимые подгруппы (по 30 человек в каждой) в зависимости от характера проводимого лечения и результатов мониторинга резистентности к антибиотикам в динамике в процессе лечебных мероприятий);

2 - пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом в стадии ремиссии, обратившиеся к стоматологу для проведения дентальной имплантации – 33 пациента;

3 - практически здоровые пациенты с интактным пародонтом, обратившиеся к стоматологу с профилактической целью – 30 человек.

Анализ частоты выявления генетических маркеров резистентности по суммарным данным показал, что наиболее часто (в 40-50%) в микробиоте выявляли гены резистентности *ErmB* и *Mef*, *Van A*, *B* а также *Bla DNA*. Минимальный уровень выявления генетических маркеров резистентности отмечен для маркеров *Mec A* и *Tet Q* (17,4%). Полученные результаты сопоставляли с данными диско-диффузионного метода определения чувствительности, что позволило провести параллели с обычной практикой.

Низкий уровень резистентности к тетрациклинам по сравнению с другими антибиотиками явился одним из аргументов для назначения схемы лечения с

использованием доксициклина, как одного из наиболее активных современных препаратов тетрациклинового ряда в биодоступной форме «солютаб».

**Глава 4** посвящена изложению материалов, полученных в ходе клинико-лабораторных исследований: с определением пародонтологического статуса пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Все виды клинических исследований, а также рентгенологические и лабораторные (микробиологические) исследования проведены, в соответствии с существующими рекомендациями: в начале исследования (фоновые показатели), затем через 3, 6 и 12 месяцев после проводимой терапии. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками. В рамках данного исследования (в течение 12 месяцев) диссертант изучил изменения устойчивости к двум основным антибактериальным препаратам в микробиоте, выделенной из образцов биоплёнки десен пациентов, проходящих лечение от пародонтита при системном назначении доксициклина в форме «Солютаб» или амоксициллина/клавуланата в сочетании с терапевтической процедурой SRP-полировки корней зубов.

**В разделе «Обсуждение результатов исследования» и в заключении** обобщены данные проведенного исследования и представлен анализ полученных результатов, их сопоставление с данными литературы.

**Выводы** обоснованы, логично вытекают из содержания диссертации и являются научно-аргументированными, соответствуют поставленным задачам и подтверждают актуальность и теоретическую и практическую значимость проведенного исследования.

**Практические рекомендации** включают рекомендации по использованию antimicrobial терапии с применением двух схем лечения – 1) амоксициллин/клавуланат натрия; 2) доксициклин/солютаб на различных этапах лечения хронического генерализованного пародонтита.

**Список литературы** оформлен по ГОСТ. Цифровые данные обработаны статистически и представлены в виде таблиц и диаграмм. Методы статистической обработки данных, используемые в работе, являются современными и корректными.



Диссертационное исследование выполнено в соответствии с научно-отраслевыми программами: 11.01 «Медицинская микробиология» и 30.04 «Вопросы хирургической стоматологии и обезболивания». Регистрационный номер темы НИР — АААА-А17-117091840021-2.

#### **Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Полученные результаты исследования были доложены Арутюняном А.А. на конференциях всероссийского и международного уровня и в полном объеме опубликованы в 13 печатных работах, включая международные, из них 6 статей - в рецензируемых изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Результаты исследования внедрены в работу стоматологической поликлиники ГАУЗ № 48 г. Москвы; используют в образовательном процессе со студентами и ординаторами кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, включены в два учебных пособия.

Существенных замечаний по оформлению диссертации нет, в тексте имеются незначительные опечатки.

**Вопрос:** Соответствуют ли полученные результаты детекции генов резистентности, выявленных у анаэробных «пародонтопатогенных» бактерий данным литературы?

#### **Заключение**

Диссертационная работа Арутюняна Александра Артемовича на тему: «Мониторинг распространенности генов резистентности к антибиотикам у больных хроническим пародонтитом», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 1.5.11 – Микробиология (медицинские науки) и 3.1.7 – Стоматология (медицинские науки), является законченным квалификационным научным трудом, выполненном под научным руководством д.м.н., профессора Е.В. Ипполитова и д.м.н. М.А. Саркисяна, в котором на основании выполненных автором исследований решена важная научная задача – повышение эффективности

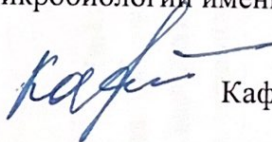
лечения хронического пародонтита у пациентов с учетом выявленных генов резистентности у представителей микробиоты полости рта к применяемым антимикробным средствам.

По своей актуальности, новизне используемых методов, объёму выполненных исследований, теоретической и практической значимости и достоверности диссертация Арутюнян А.А. «Мониторинг распространенности генов резистентности к антибиотикам у больных хроническим пародонтитом» соответствует требованиям, установленным п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции от 11.09.2021 г. №1539), применяемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Арутюнян Александр Артемович заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 1.5.11 – микробиология (медицинские науки) и 3.1.7. – стоматология (медицинские науки).

#### Официальный оппонент

Руководитель отдела микробиологии,  
Заведующая лабораторией кишечных инфекций,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,

д.м.н. (1.5.11 – микробиология)

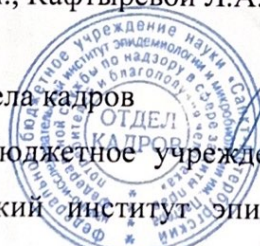


Кафтырева Лидия Алексеевна

*12 сентября 2023 г.*

Подпись д.м.н., Кафтыревой Л.А. заверяю:

Начальник отдела кадров



Чебакова Лариса Владимировна

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт – Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт -Петербург, ул. Мира 14); Телефон: +7(812)2331762 e-mail: [pasteur@pasteurorg.ru](mailto:pasteur@pasteurorg.ru)

**В диссертационный совет 21.2.016.06**

при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(Делегатская ул., д.20, стр.1, г. Москва, 127473)

**СВЕДЕНИЯ**

Об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Артуровича Александра Александровича, соискателя ученой степени кандидата медицинских наук на тему: «Мониторинг распространённости генов резистентности к антибиотикам у больных хроническим пародонтитом» по специальностям: 1.5.11 – «Микробиология» (медицинские науки), 3.1.7 – «Стоматология» (медицинские науки).

Фамилия, Имя, Отчество (полностью)	Ученая степень, наименование отрасли науки, научных специальностей, по которым им защищена диссертация.	Полное название организации, являющейся основным местом работы официального оппонента (на момент представления отзыва)	Занимаемая должность в организации (на момент представления отзыва)	Список основных публикаций в рецензируемых научных изданиях (не менее 5-ти работ за последние 5 лет желательного по теме оппонированной диссертации)
Кафтырева Лидия Алексеевна	доктор медицинских наук, специальность 1.5.11 – микробиология (медицинские науки)	Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт – Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере	Руководитель отдела микробиологии Заведующая лабораторией кишечных инфекций	<p>1. Результаты эпидемиологического и микробиологического мониторинга инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в республике Северная Осетия – Алания / Н.Р. Хабалова, Л.В. Лялина, Л.А. Кафтырева // Здоровье населения и среда обитания - ЗНисО. – 2022. – Т. 30, № 7. – С. 57-65.</p> <p>2. Молекулярная эпидемиология инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / Н.Р. Хабалова, Л.А. Кафтырева, Л.В. Лялина, А.К. Бутаева, Л.М. Бутаева, М.Э. Хапсаева //</p> <p>3. Характеристика этиологической структуры инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи в многопрофильном</p>

	защиты прав потребителей и благополучия	<p>197101, Россия, г. Санкт - Петербург, ул. Мира, д. 14. www.pasteurog.ru</p> <p>стационаре / Б.Н. Котияв, Б.Ю. Гумилевский, Е.Н. Колосовская, Л.А. Кафтырева, Е.С. Орлова, Ф.В. Иванов, А.И. Соловьев // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2020. – № 1(69). – С. 7-11.</p> <p>4. Филогенетические группы и гены вирулентности штаммов <i>Escherichia coli</i>, выделенных из микробиоты кишечника детей / Л.В. Сужаева, М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 251-257.</p> <p>5. Практические рекомендации по пренаталитическому этапу микробиологических исследований // Часть I. Бактериологические исследования / Е.В. Алиева, Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова, И.С. Тартаковский // Лабораторная служба. – 2020. – Т. 9, № 2. – С. 45-66.</p> <p>6. Апробация отечественных тест-полосок, предназначенных для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам методом градиентной диффузии (Е-Тест) / И.В. Лихачев, Л.А. Краева, А.А. Самойлова, Е.В. Рогачева, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Н.В. Михайлов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 9. – С. 557-561.</p> <p>7. Чувствительность к антибиотикам, механизмы резистентности и филогенетическая структура популяции <i>S. Typhi</i>, выделенных в 2005-2018 гг. в Российской Федерации / С. А. Егорова, К. В. Кулешов, Л. А. Кафтырева, З. Н. Матвеева // Инфекция и иммунитет. - 2020. - Т. 10, №1. - С. 99-110.</p>
--	---	---

Согласен на обработку персональных данных:

Д.М.Н., профессор

« 20 » июня 2023 г.



Кафтырева Лидия Алексеевна

Подпись Д.М.Н., профессора Кафтыревой Л.А. заверяю:  
Ученый секретарь ученого совета  
К.М.Н.



Трифонова Галина Федоровна

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт – Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт -Петербург, ул. Мира 14)  
Телефон: +7(812)2644-63-18; e-mail: [pasteur@pasteurog.ru](mailto:pasteur@pasteurog.ru)

