

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора **Арзуманян Веры Георгиевны** на диссертационную работу **Кулько Александра Борисовича** «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### Актуальность темы исследования

К настоящему времени число описанных возбудителей микозов человека составляет более 500 видов грибов, крайне разнообразных по таксономии, биологическим свойствам и степени патогенности. В группу болезнетворных грибов, способных вызывать опасные инфекционные заболевания человека, включены многие виды микромицетов, ранее считавшиеся непатогенными. К известным нозологиям глубоких оппортунистических микозов – аспергиллезу, кандидозу, криптококкозу и зигомикозу добавились более редкие варианты: гиалогифомикоз, феогифомикоз, группа редких дрожжевых микозов. Чувствительность к лекарственным препаратам большинства вероятных возбудителей глубоких инвазивных микозов и пневмомикозов остается мало исследованной, а лабораторная диагностика внутрибольничных микотических заболеваний – недостаточно разработанной.

Пневмомикозы – сложные для диагностики оппортунистические заболевания инфекционной природы с недостаточной специфичностью клинико-рентгенологических признаков, часто ассоциированные с первичными заболеваниями бронхолегочной системы. Их своевременная диагностика относится к актуальным клинико-лабораторным задачам противотуберкулезных учреждений, пациенты которых входят в группу риска развития аспергиллеза и других микозов бронхов и легких. Ведущее значение в дифференциальной диагностике пневмомикозов имеют



лабораторные данные специальных микробиологических и серологических исследований материала от пациентов с подозрением на пневмомикоз.

В связи с этим, диссертационная работа Кулько Александра Борисовича, целью которой является изучение свойств условно-патогенных грибов, способных колонизировать нижние дыхательные пути и вызывать развитие легочных инфекций у больных туберкулезом органов дыхания, является актуальной и позволяет усовершенствовать подходы к лабораторной диагностике оппортунистических бронхолегочных пневмомикозов во фтизиатрической клинике.

### **Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Впервые у больных туберкулезом обнаружен и охарактеризован состав вероятных возбудителей вторичных микозов бронхов, легких и плевры; выявлен состав условно-патогенных грибов, способных колонизировать у пациентов с фоновым туберкулезом нижние отделы респираторного тракта, развиваться в деструктивных полостях в легких и плевральных полостях.

Полученные автором результаты исследования молекулярно-генетических и морфологических свойств *Aspergillus sydowii* указывают на характерную для этого возбудителя аспергиллеза высокую степень изменчивости, что имеет научную ценность, и что следует учитывать при проведении видовой идентификации грибов *Aspergillus* spp. как по генотипическим, так и по фенотипическим признакам.

При исследовании чувствительности к антимикотикам выделенных при диагностике пневмомикозов 34 видов микромицетов, автором получены новые сведения об уровнях активности современных лекарственных препаратов в отношении основных и редких возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и ряда возбудителей редких дрожжевых микозов родов *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*. Сформированы списки видов возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, редких дрожжевых микозов, обладающих сниженной



чувствительностью к отдельным широко применяемым в клинической практике противогрибковым препаратам и группам лекарственных средств (триазольным антимикотикам, эхинокандинам).

В диссертационной работе доказана необходимость стандартизации этапов комплексной лабораторной диагностики бронхолегочных микозов для своевременного обнаружения и эффективной терапии микотических поражений бронхов, легких и плевры у больных туберкулезом.

В целом, сформулированные А.Б. Кулько научные положения, выводы и рекомендации обоснованы и соответствуют результатам проведенных им исследований.

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

Теоретическая и практическая значимость работы не вызывает сомнений.

Автором получены новые сведения о свойствах широко распространенных в природе условно-патогенных грибов, имеющие теоретическую значимость для изучения ключевых природных свойств возбудителей глубоких микозов человека и их вирулентности. Охарактеризованы уровни чувствительности к современным антимикотикам и группам препаратов у 34 видов условно-патогенных грибов; представлены сведения о степени термотолерантности у 67 видов условно-патогенных грибов и групп возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых микозов.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанный автором комплекс клинически значимых лабораторных методов позволяет осуществлять у больных туберкулезом легких необходимую диагностику вторичных бронхолегочных микозов различной локализации: инвазивный микоз; микоз, локализованный в легочной полости; микотическое поражение плевры; колонизация нижних дыхательных путей, а также проводить прикладные научные исследования по изучению свойств дрожжевых и мицелиальных возбудителей, включая резистентность к антимикотикам.



Автором предложен предпочтительный формат лабораторного обследования пациентов на пневмомикоз с количественной оценкой содержания грибов в респираторном материале в динамике; стандартизованы алгоритмы микробиологической диагностики плесневых и дрожжевых пневмомикозов, позволяющие получать достоверные и воспроизводимые результаты идентификации и определения чувствительности возбудителей к антимикотикам; обоснована и внедрена в протокол исследования на аспергиллез процедура тестирования возбудителей к антимикотикам методом микроразведений с использованием модифицированной методики приготовления споровой суспензии культур грибов *Aspergillus* spp., которая повышает достоверность результатов и безопасность тестирования чувствительности; приведены в соответствие стандартам диагностики критерии интерпретации получаемых результатов исследования на глубокий микоз респираторного, хирургического биоматериалов и сыворотки крови.

Для работы с культурами возбудителей пневмомикозов разработана оригинальная авторская схема быстрого разделения штаммов грибов на группы, позволяющая надежно дифференцировать известные возбудители глубоких микозов с поражением легких на принятые в микологии группы с разными уровнями исходной чувствительности к антимикотикам.

Все 67 видов грибов, выделенных из посевов биоматериала, представлены клиническими штаммами в коллекции условно-патогенных микромицетов, созданной с целью дальнейшего изучения их генотипических и фенотипических признаков, а также для продолжения совместных с Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» практических исследований по поиску новых природных антибиотиков с антифунгальной активностью.

#### **Достоверность и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием теоретически обоснованных методических подходов,



адекватным поставленной цели и задачам диссертационной работы; применением комплекса классических и современных микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических методов исследования; значительным объемом выборки исследованных штаммов дрожжевых грибов (3594 штаммов), мицелиальных грибов (1136 штаммов) и образцов различного клинического материала от больных туберкулезом, а также большим объемом проведенных микроскопических (при первичной и вторичной микроскопии), культуральных, серологических исследований и исследований состава микромицетов в воздухе лечебного стационара.

Обнаруженные качественные и количественные показатели подвергнуты корректной статистической обработке, экспериментальные данные по активности антимикотиков в отношении микромицетов сопоставимы с данными научной литературы.

Результаты исследований были доложены на 22 международных, всероссийских и региональных конференциях. По материалам диссертации автором опубликованы 73 печатные работы, в том числе 20 статей в рецензируемых изданиях, 3 методических рекомендаций. Публикации в полной мере отражают основные положения диссертационной работы.

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

Диссертационная работа Кулько А.Б. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, приложений. Диссертация изложена на 374 страницах, содержит 61 таблицу и 70 рисунков. Библиография включает 414 источников, из которых 146 отечественных, 268 зарубежных.

Во введении раскрывается актуальность исследования, представлены цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту. Автором подробно описаны методология и методы исследования.



В обзоре литературы (глава 1) представлены современные сведения о составе, таксономии, систематике, номенклатуре, биологии, морфологии, наличии чувствительности и устойчивости к применяемым антимикотикам возбудителей бронхолегочных микозов и глубоких микозов с поражением легких; показана актуальность проблемы верификации вторичных пневмомикозов у пациентов с фоновым туберкулезом органов дыхания; проведен анализ разрабатываемых методологических подходов к проблеме лабораторной диагностики оппортунистических микозов органов дыхания с учетом возможностей микробиологических (микологических), иммунологических и молекулярных методов исследования.

В главе 2 раздела результатов собственных исследований автор обосновывает и излагает апробированные алгоритмы комплексной лабораторной диагностики бронхолегочных микозов у больных туберкулезом органов дыхания, включающие: схему обследований на пневмомикоз и диссеминированный микоз с детализацией предлагаемых клинически значимых методик исследования и характеристик диагностических биоматериалов; стандартизованные алгоритмы микробиологической диагностики пневмомикозов, вызванных дрожжевыми и плесневыми возбудителями; критерии интерпретации результатов микробиологических исследований и серодиагностики.

Глава 3 посвящена описанию состава, свойств и классификации болезнетворных грибов, обнаруженных при диагностике бронхолегочных и диссеминированных микозов (кандидемия, криптококкоз центральной нервной системы) у больных туберкулезом. Представлены данные по количеству выделенных из различного диагностического материала клинических штаммов 67 видов грибов из 24 родов; количеству и соотношению выявленных термотолерантных штаммов в различных группах возбудителей микозов; особенностям морфологии клинических штаммов 67 видов грибов-оппортунистов; особенностям молекулярно-генетических свойств гриба *Aspergillus sydowii*. Подробно проанализирован спектр



вероятных возбудителей пневмомикозов у больных туберкулезом с анализом числа случаев и частоты их обнаружения в биоматериалах.

В главе 4 представлен анализ данных лабораторных обследований больных туберкулезом, полученных при диагностике кандидоза легких и кандидемии (микробиологические исследования, серодиагностика), криптококкоза легких и центральной нервной системы (микробиологические исследования, серодиагностика), редких дрожжевых микозов с поражением легких (микробиологические исследования).

В главе 5 представлен анализ полученных сведений по лабораторной диагностике у больных туберкулезом аспергиллеза легких (микробиологические исследования, серодиагностика), бронхолегочных зигомикоза (микробиологические исследования), гиалогифомикозов (микробиологические исследования), феогифомикозов (микробиологические исследования).

В главе 6 изложены полученные автором результаты скринингового исследования чувствительности к современным антимикотикам штаммов возбудителей аспергиллеза (исследовано 12 видов), кандидоза (14 видов), криптококкоза (2 вида), редких дрожжевых микозов (6 видов), с определением и последующей интерпретацией значений минимальных подавляющих концентраций препаратов: флуконазол, итраконазол, вориконазол, позаконазол, кетоконазол (5 препаратов группы азолов), анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин (3 препарата группы эхинокандинов), амфотерицин В, флуцитозин. По результатам тестирования установлены виды возбудителей глубоких микозов с поражением легких с вариативной, сниженной чувствительностью и устойчивые к широко применяющимся в терапии микозов лекарственным препаратам.

В главе 7 приведены сведения по составу и сезонной динамике микобиоты воздушной среды противотуберкулезного стационара; присутствию в воздухе стационара жизнеспособных зачатков возбудителей аспергиллеза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза. С



использованием адекватных статистических методов сопоставлены видовой состав и структура грибного аэропланктона стационара с группами мицелиальных грибов, колонизирующих дыхательные пути пациентов, развивающихся в легочных и плевральных полостях.

Анализ наиболее значимых результатов диссертационного исследования проведен автором в разделе «Заключение». Выводы и практические рекомендации изложены детально, логично вытекают из полученных в работе результатов. Практические рекомендации и приложения применимы в лабораторной практике.

### **Замечания по диссертационной работе**

Имеющиеся замечания не носят принципиального характера и касаются допущенной терминологической неточности формулировки и замечаний по оформлению иллюстративно-графического и табличного материала. Возникший в процессе рецензирования работы вопрос имеет дискуссионный, уточняющий характер.

На стр. 159 диссертации (стр. 23 автореферата) написано о *Saccharomyces cerevisiae* как о дрожжеподобных грибах, а не дрожжах – это, вероятно, описка автора. Данная ошибка носит случайный характер и не встречается более в тексте диссертации.

Текст диссертации трудно воспринимается из-за отсутствия выделения названий рисунков и таблиц жирным шрифтом, а также более мелких шрифтов в таблицах и их названиях.

На графических рисунках 68, 69 знаки процентов размерности (%) проставлены возле каждого значения на оси ординат, а нужно – только один раз в конце оси.

Вопрос к диссертанту:

При интерпретации количественного содержания грибов рода *Candida* в мокроте Вы учитывали, что в норме число колоний любого вида *Candida*, выросших из 1 мл мокроты, не должно превышать  $1 \times 10^3$  КОЕ/мл. Выделение гриба рода *Candida* из мокроты в количестве  $>1 \times 10^3$  КОЕ/мл было



использовано Вами в качестве признака вероятного развития кандидозной инфекции. Однако этот критерий установлен достаточно давно и возможно устарел (завышен). Не планируете ли Вы в дальнейшем провести новые клинико-лабораторные исследования для проверки его эффективности и актуальности при диагностике кандидоза бронхов?

Выявленные замечания и поставленный вопрос не снижают общей высокой оценки научной и практической ценности работы.

#### **Соответствие специальности**

Диссертационная работа Кулько А.Б. соответствует формуле и области исследования специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки): пункты 2 – «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и 6 – «Сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов».

#### **Заключение**

Диссертационная работа Александра Борисовича Кулько на тему «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика» является законченным научным трудом, содержащим решение актуальной научно-практической проблемы – изучение спектра видового состава и свойств условно-патогенных грибов, вызывающих поражения бронхолегочной системы у больных туберкулезом, и совершенствование методических подходов к лабораторной диагностике вторичных пневмомикозов у пациентов фтизиатрического профиля, имеющей важное значение для микробиологии.

Диссертационная работа Кулько Александра Борисовича на тему «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует



требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, № 650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года, № 1168 от 01 октября 2018 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Кулько Александр Борисович, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

### **Официальный оппонент**

Заведующий лаборатории физиологии грибов и бактерий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», доктор биологических наук, профессор



**Арзуманян Вера Георгиевна**

Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а  
Тел. +7 (495) 917-09-03, e-mail: veraar@mail.ru

Подпись доктора биологических наук, профессора Арзуманян Веры Георгиевны заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», кандидат медицинских наук



**Жирова Светлана Николаевна**

29.04.2020 г.