

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича на диссертационную работу Кулько Александра Борисовича «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Объективная оценка значения условно-патогенных мицелиальных и дрожжевых грибов в развитии внутрибольничных бронхолегочных инфекций является актуальной проблемой микробиологии и современной медицины. Это во-многом определяет эффективность борьбы с целым рядом грибковых поражений, в частности, с легочными формами аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза и многими другими. Поскольку понимание биологии возбудителя является научной основой для разработки новых подходов к лабораторной диагностике, профилактике и лечению самых различных заболеваний и особенно актуально ввиду недостаточной разработанности при пневмомикозах. Указанная проблема сверхактуальна для своевременной дифференциальной диагностики оппортунистических бронхолегочных форм микозов у пациентов с первичным туберкулезом органов дыхания.

Указанное обусловлено тем, что клинико-рентгенологические признаки микотических поражений легких неспецифичны и во многом сходны с признаками туберкулеза и ряда других заболеваний. В этой связи ведущее значение в диагностике бронхолегочных микозов имеют результаты лабораторных исследований – прямой микроскопии, культуральных и некультуральных методов. Однако значительный диагностический потенциал лабораторных методов используется в настоящее время в рутинной практике микробиологических лабораторий не в полной мере ввиду технической сложности, продолжительности исследования и отсутствием до настоящего времени достаточной научно-теоретической базы.

Все вышеуказанное определяет актуальность рассматриваемой научной работы и свидетельствует о научно-практической перспективе представленных в ней обоснованных и стандартизированных подходов к лабораторной диагностике бронхолегочных микозов у больных туберкулезом – от диагностики до интерпретации получаемых результатов.

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

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертантом впервые подробно охарактеризован видовой состав грибов, вызывающих поражение бронхов, легких и плевры у больных туберкулезом органов дыхания; установлена таксономия микромицетов, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, полости легких и

плевральные полости. Полученные данные позволяют оценивать риски развития пневмомикозов у данной категории пациентов.

По данным проведенного филогенетического анализа штаммов *Aspergillus sydowii* по последовательности рибосомальной ДНК показано наличие у представителей данного вида генетической и фенотипической гетерогенности клинических штаммов указанного возбудителя аспергиллеза.

Исследована чувствительность клинических штаммов дрожжевых грибов и мицелиальных грибов рода *Aspergillus*, выделенных от больных туберкулезом, к противогрибковым препаратам. Установлены природные уровни активности современных азольных антимикотиков, препаратов группы эхинокандинов, амфотерицина В и флуцитозина в отношении 12 видов возбудителей аспергиллеза, 14 видов возбудителей кандидоза, 2 видов возбудителей криптококкоза, 6 видов возбудителей редких дрожжевых микозов. Количественная оценка чувствительности с определением минимальных подавляющих концентраций препаратов позволила выявить различия среди возбудителей глубоких микозов человека и сниженную чувствительность к отдельным широко применяемым антимикотикам.

Диссертантом научно обоснована необходимость стандартизации этапов комплексной лабораторной диагностики мицелиальных и дрожжевых пневмомикозов для повышения эффективности верификации микотических поражений бронхолегочной системы у пациентов, находящихся на обследовании или лечении в противотуберкулезных учреждениях.

Положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации основаны на результатах проведенных исследований, аргументированы, адекватны поставленной цели и задачам исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы

В диссертационной работе Кулько А.Б. разработана и реализована методология организации научных исследований, связанных с проблематикой оппортунистических бронхолегочных микозов – их этиологией, распространением, исследованием свойств возбудителей, лабораторной диагностикой, вопросами резистентности к известным антимикотикам и разработкой новых препаратов для специфической лекарственной терапии.

Автору дополнены и уточнены имеющиеся в научной литературе описания отдельных видов микроскопических грибов и основных групп возбудителей оппортунистических глубоких микозов. Теоретическую значимость имеют полученные сведения о природной чувствительности 34 видов грибов к современным лекарственным препаратам и группам антимикотиков; новые данные о термотолерантности как факторе вирулентности для 67 видов болезнетворных грибов, а также для основных групп возбудителей.

Практическая значимость работы определяется разработкой адаптированных для исследований *in vitro* алгоритмов лабораторной диагностики бронхолегочных микозов различной этиологии. Научно обоснованы и сгруппированы в кластеры основные критерии интерпретации

получаемых результатов. Для внедрения во фтизиатрическую практику разработаны схема исследования диагностического материала на пневмомикоз у больных туберкулезом органов дыхания. Автором даны рекомендации по выбору антимикотиков и целесообразности определения чувствительности к антимикотикам на основании установленной исходной чувствительности изученных возбудителей к препаратам.

Особый интерес для науки и практики представляет уникальная авторская схема, предложенная для быстрого и точного разделения вероятных возбудителей пневмомикозов на самостоятельные группы, с использованием для распознавания штаммов простых морфологических и биохимических признаков.

Разработанные Кулько А.Б. схема описания клинических штаммов грибов рода *Aspergillus* и сводная таблица основных диагностических признаков 14 условно-патогенных видов рода *Aspergillus* рекомендованы для использования при видовой идентификации возбудителей аспергиллеза. Модифицированная автором методика приготовления споровой суспензии культур возбудителей аспергиллеза адаптирована для широкого применения при определении чувствительности к антимикотикам грибов рода *Aspergillus* как с помощью метода микроразведений, так и диско-диффузионным методом.

Методические разработки по лабораторной диагностике пневмомикозов у больных туберкулезом положены в основу методических рекомендаций регионального уровня, утвержденных Департаментом здравоохранения города Москвы: «Лабораторная диагностика бронхолегочных микозов у больных туберкулезом» (№9 от 2007 г. – утверждены 07.05.2007 г.), «Лабораторная диагностика легочных микозов во фтизиатрической клинике» (№24 от 2019 г. – утверждены 17.04.2019 г.).

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность результатов диссертации подтверждается использованием оптимального комплекса стандартизованных и воспроизводимых микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических методов и методик, соответствующим задачам исследования.

Результаты и выводы основаны на большом объеме фактических данных. Выделено и идентифицировано до вида с исследованием температурных границ роста 4730 клинических штаммов грибов отделов *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*. Изучена в исследовательских целях чувствительность к современным антимикотикам у 631 клинического штамма из групп возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, редких дрожжевых микозов. Проанализированы результаты микробиологических и иммунологических исследований биоматериалов от 7683 больных туберкулезом с подозрением на пневмомикоз, включая 61 больного с сопутствующей ВИЧ-инфекцией. Данные обработаны с

использованием современных методов статистической обработки количественных и качественных показателей.

Материалы исследований доложены на 22 международных, всероссийских и региональных конференциях. Результаты диссертационной работы полно отражены в опубликованных 73 печатных работах, в том числе в 20 статьях в рецензируемых изданиях, 1 авторской монографии, 2 коллективных монографиях, 3 методических рекомендациях.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Кулько Александра Борисовича выстроена традиционно и изложена на 374 страницах машинописи, иллюстрирована 61 таблицей, 70 рисунками, включая 60 авторских фотографий микромицетов с 2 приложениями. Состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, приложений.

Во введении представлены актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту. В отдельном подразделе введения автором изложена методология и методы исследования, описаны объекты исследования, сведены в удобные таблицы использованные в работе критерии интерпретации значений минимально подавляющих концентраций лекарственных препаратов для различных возбудителей кандидоза и аспергиллеза.

Обзор литературы основан на анализе 414 публикаций отечественных и зарубежных авторов и состоит из трех подразделов. Включает полные сведения о биологии, морфологии и патогенности оппортунистических и первично-патогенных грибов, поражающих бронхолегочную систему человека, об особенностях их современной систематики и номенклатуры, о таксономическом составе и свойствах групп болезнетворных дрожжевых и мицелиальных грибов. Описаны факторы риска развития внутрибольничных пневмомикозов у больных туберкулезом легких, изложены сведения о распространенности и спектре микотических заболеваний бронхолегочной системы, ассоциированных с туберкулезом органов дыхания. Проанализированы значение, диагностические возможности и особенности лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов, включая микробиологические, иммунологические и молекулярные методы. Обзор завершает сводная таблица, где обобщены сведения о возбудителях и клинических вариантах вторичных глубоких микозов с поражением легких и суммирована оценка возможностей лабораторных методов для их диагностики.

Вторая глава посвящена изложению разработанных алгоритмов комплексной лабораторной диагностики микозов органов дыхания у больных туберкулезом легких и критериев интерпретации результатов. Автором

представлены схема проведения микробиологических исследований респираторного и хирургического материалов, иммунологических и культуральных исследований крови при обследовании пациентов; алгоритмы микробиологической диагностики плесневых и дрожжевых пневмомикозов с изложением методик исследования разных групп возбудителей; критерии интерпретации получаемых микробиологических и иммунологических данных. Эффективность предложенных методик микроскопических и культуральных исследований при диагностике различных вариантов пневмомикозов подтверждена оригинальными фотографиями.

В третьей главе охарактеризован видовой и таксономический состав обнаруженных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных туберкулезом. Описаны важнейшие свойства и диагностические признаки 67 видов выделенных грибов-оппортунистов – характерные морфологические признаки и их вариативность, способность к росту *in vitro* при 35°C и 37°C; оценена степень изменчивости генотипических и фенотипических признаков возбудителя аспергиллеза *Aspergillus sydowii*. Выделенные 67 видов грибов разделены автором на группы часто встречаемых, среднераспространенных и редко встречаемых возбудителей, в зависимости от частоты обнаружения у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов. Представлены сведения по частоте обнаружения и составу грибов, обнаруженных в содержимом легочных и плевральных полостей, респираторного материала, крови, спинномозговой жидкости, канала эндобронхиального клапана.

В четвертой главе проанализированы результаты применения разработанных алгоритмов лабораторной диагностики для верификации у пациентов бронхолегочных и диссеминированных инфекций, вызванных дрожжевыми грибами. Глава разделена на три подраздела, в которых представлены данные микробиологических и иммунологических исследований по диагностике кандидоза легких и кандидемии, данные микробиологических и иммунологических исследований по диагностике криптококкоза легких и центральной нервной системы, данные микробиологических исследований по диагностике редких дрожжевых микозов с поражением легких.

В пятой главе проведен анализ результатов применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных мицелиальными грибами. Глава разделена на четыре подраздела, в которых представлены данные по лабораторной диагностике аспергиллеза легких (результаты микробиологических и иммунологических исследований), зигомикоза, гиалогифомикозов, феогифомикозов.

В шестой главе изложены сведения по установленным уровням чувствительности к современным лекарственным препаратам у грибов *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., видов возбудителей редких дрожжевых микозов. На большом фактическом материале показана активность препаратов группы азолов, препаратов группы эхинокандинов, амфотерицина В, флуцитозина в отношении 14 видов грибов рода *Candida*, 8

видов дрожжевых грибов не из рода *Candida* (родов *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*), 12 видов грибов рода *Aspergillus*. Исследована проблема развития вторичной устойчивости к триазольным препаратам у ряда возбудителей кандидоза, включая штаммы, выделенные от больных с ВИЧ-инфекцией. Проведена оценка целесообразности тестирования чувствительности к широко применяемым в терапии антимикотикам у широкого ряда возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и возбудителей редких дрожжевых инфекций перед назначением лекарственной терапии.

В седьмой главе приведены результаты многолетнего мониторинга сезонной динамики присутствия в воздухе противотуберкулезного стационара спор мицелиальных грибов; сопоставлен их состав и структура микобиоты воздуха лечебного стационара с характеристиками микобиоты, развивающейся у пациентов в дыхательных путях, в легочных и плевральных полостях.

В разделе «Заключение» кратко описаны, проанализированы и обобщены основные результаты проведенных исследований, дана их оценка с использованием литературных сведений, подчеркнута значимость результатов для дальнейшего углубленного изучения условно-патогенной микобиоты, диагностической и научно-исследовательской работы.

Выводы достоверны, убедительны, полностью соответствуют поставленным задачам и являются логичным результатом завершеного исследования.

Приведенные в конце работы приложения имеют самостоятельное научно-практическое значение по теме диссертации, обосновывают 4 положение, выносимое на защиту и органично связаны с предоставленными в 3 главе описаниями морфологии и микрофотографиями клинических штаммов 14 видов грибов рода *Aspergillus*.

Таким образом, диссертационная работа Кулько Александра Борисовича может быть классифицирована как завершенное научное исследование, соответствующее требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Значение исследования состоит в решении научной проблемы благодаря полученным результатам, которые могут использоваться в работе научных и прикладных лабораторий, занимающихся исследованиями в области диагностики и лечения глубоких микозов.

Соответствие специальности

Диссертационная работа, выполненная Кулько Александром Борисовичем, по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам, полностью соответствует формуле специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки) со следующими областями исследований: выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов (пункт 2 паспорта специальности); морфология,

физиология, биохимия и генетика микроорганизмов (пункт 3); сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов (пункт 6).

Замечания по диссертационной работе

Принципиальных замечаний по диссертации нет. В процессе рецензирования диссертационной работы возник ряд вопросов.

1. Чем может объясняться высокая частота обнаружения достаточно редкого возбудителя кандидоза *Candida guilliermondii* в качестве этиологического агента кандидемии у больных туберкулезом?
2. Вами установлено, что доля пациентов с признаками бронхолегочного кандидоза была значимо выше в группе больных с ВИЧ-инфекцией по сравнению с группой ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом. И напротив, при диагностике пневмомикозов грибы рода *Aspergillus* были выявлены только у ВИЧ-отрицательных пациентов. Какова причина отсутствия признаков развития аспергиллеза у ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом, тогда как подобные признаки регулярно выявлялись у ВИЧ-отрицательных пациентов?
3. В перспективах дальнейшей разработки темы диссертации Вами анонсировано начало изучения чувствительности к антимикотикам у грибов зигомицетов и аскомицетовых плесневых грибов не из рода *Aspergillus*. Каков круг предполагаемых методических трудностей для практического определения чувствительности у этих групп плесневых микромицетов методом микроразведений? Планируется ли в дальнейшем использование показателя минимальной эффективной концентрации для оценки активности эхинокандинов против грибов рода *Aspergillus*, что рекомендовано организациями CLSI и EUCAST?

Возникшие вопросы носят уточняющий характер и не снижают общей научной и практической ценности рецензируемой работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа Кулько Александра Борисовича на тему «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика» является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором обширных исследований и ряда разработок осуществлено решение важной научно-практической проблемы – определения видового и таксономического состава и основных характерных свойств возбудителей оппортунистических микозов бронхов и легких у больных туберкулезом органов дыхания, что позволило подробно охарактеризовать отдельные группы дрожжевых и плесневых возбудителей пневмомикозов и разработать универсальную схему лабораторной диагностики различных вариантов вторичных пневмомикозов, имеющую большое научно-практическое значение для микробиологии.

Диссертационная работа Кулько Александра Борисовича «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 полностью соответствует требованиям пункта 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 кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России), заслуженный деятель науки РБ, доктор медицинских наук, профессор



Мавзютов Айрат Радикович

Адрес ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России:
450008, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3;
Тел.: (347) 2721160; Факс: (347) 2723751;
E-mail: rectorat@bashgmu.ru, ufalab@mail.ru

