

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Сергеева Алексея Юрьевича 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

Оппортунистические пневмомикозы – весьма сложные для диагностики грибковые инфекции. Их отличает широкий спектр клинических проявлений: от бессимптомной колонизации слизистой бронхов до инвазивных форм с распространенным поражением легочной ткани. Вызванные различными по таксономии и морфологии условно-патогенными грибами, бронхолегочные микозы распространены повсеместно, что объясняется убиквитарным характером распространения их возбудителей: как плесеней в антропоценозах, так и дрожжевой биоты – в составе микробиома человека. В последние годы возрастает значение пневмомикозов и глубоких микозов с поражением легких как внутрибольничной инфекции, расширяется спектр их возбудителей.

Аспергиллез и некоторые другие бронхолегочные микозы нередко развиваются на фоне туберкулеза легких, осложняя течение туберкулеза у пациентов, госпитализированных во фтизиатрические клиники. Очевидно, что диагностика вторичных бронхолегочных инфекций, вызванных различными видами плесневых и дрожжевых условно-патогенных грибов, подбор противогрибковых препаратов для проведения терапии необходимо входят в задачи клинико-лабораторных исследований противотуберкулезных учреждений. Ведущее значение в диагностике микозов легких и их дифференциальной диагностике с туберкулезом и другими заболеваниями легких принадлежит результатам специальных микробиологических,

иммунологических и иных лабораторных исследований, позволяющих обнаруживать и идентифицировать возбудитель, а также определять чувствительность к антимикотикам.

Таким образом, диссертационная работа Кулько Александра Борисовича, посвященная изучению состава и свойств возбудителей бронхолегочных микозов, а также совершенствованию лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов у больных туберкулезом легких, является безусловно актуальной и своевременной.

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

А.Б. Кулько впервые удалось провести определение видового состава грибов, колонизирующих нижние отделы дыхательных путей и вызывающих развитие микозов бронхов, легких и плевры у больных туберкулезом органов дыхания. По результатам посевов крови и спинномозговой жидкости определен состав дрожжевых грибов – возбудителей кандидемии и криптококкоза центральной нервной системы, выявлявшихся достоверно чаще у больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией.

Сравнительный анализ молекулярных признаков по участкам рДНК (ITS/5.8S регион и D1/D2 28S) и морфологических признаков штаммов гриба *Aspergillus sydowii* выявил у данного возбудителя аспергиллеза наличие генетической гетерогенности и отличия по фенотипу у разных по генотипу клинических штаммов.

Автором исследована активность современных противогрибковых препаратов и групп лекарственных средств в отношении 34 видов аскомицетовых и базидиомицетовых грибов из родов *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*. Обнаружены виды условно-патогенных грибов, обладающие сниженной или вариативной чувствительностью к широко применяемым в терапии лекарственным препаратам. Полученные новые актуальные данные об уровнях чувствительности к 10 системным антимикотикам у 12 видов

возбудителей аспергиллеза дополняют подробные сведения о свойствах и признаках болезнетворных грибов рода *Aspergillus*, изложенные диссертантом в иллюстрированной авторской монографии «Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций».

По результатам обследования 7683 пациентов с различными формами туберкулеза, включая 61 больного с сопутствующей ВИЧ-инфекцией, автором обоснована необходимость проведения и стандартизации этапов лабораторной диагностики оппортунистических бронхолегочных микозов во фтизиатрической клинике.

Представленные в диссертационной работе научные положения, выводы и практические рекомендации четко сформулированы и основаны на результатах проведенным автором исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы

Автором получена и структурирована важная микологическая информация, имеющая значение для решения ряда теоретических вопросов клинической микробиологии: проанализирована способность к росту при 37°C у 67 видов условно-патогенных грибов, развивающихся в дыхательных путях у больных туберкулезом, с разделением их на группы по соотношению выявленных термотолерантных клинических штаммов; исследована активность современных противогрибковых препаратов и групп лекарственных средств в отношении 34 видов аскомицетовых и базидиомицетовых грибов из 8 родов. Важное прикладное значение имеют сведения о наличии характерных диагностических признаков у клинических штаммов 67 условно-патогенных видов грибов, обнаруженных у больных туберкулезом при диагностике пневмомикозов.

Клинические штаммы дрожжевых и плесневых грибов из созданной диссертантом коллекции микромицетов были использованы в работе для оценки перспектив применения молекулярно-генетических методов при идентификации трудно распознаваемых по морфологии возбудителей

аспергиллеза и при исследованиях активности новых природных антибиотиков, разрабатываемых в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе».

Диссертационная работа имеет высокую практическую значимость для организации в противотуберкулезном ЛПУ лабораторной диагностики пневмомикозов различной этиологии и локализации. Автором разработаны: комплекс эффективных клинически значимых методов лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов у больных туберкулезом, адаптированный для рутинных и мониторинговых исследований и четкие, унифицированные критерии интерпретации получаемых результатов. Применение стандартизованных алгоритмов диагностики позволяет выявлять у пациентов признаки развития вторичных бронхолегочных аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых микозов, а также получать необходимые достоверные сведения о видовой принадлежности возбудителя и его свойствах.

Автором предложен ряд новых методических решений, расширяющих возможности рутинных микологических исследований: схема быстрого разделения обнаруживаемых в посевах клинических штаммов грибов на группы возбудителей пневмомикозов с разными уровнями чувствительности к антимикотикам; модифицированная методика приготовления споровой суспензии культур возбудителей аспергиллеза, адаптированная для проведения тестирования чувствительности к антимикотикам стандартизованным методом микроразведений и диско-диффузионным методом.

Особое значение имеют полученные диссертантом данные об активности антимикотиков в отношении широкого ряда возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и редких дрожжевых инфекций, а также представленные на их основании рекомендации по целесообразности проведения лабораторного тестирования чувствительности.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения и определяется корректностью применяемых методологических подходов, основанных на анализе современной специализированной литературы; использованием широкого спектра классических и современных микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов исследования; обширным объемом собранных, проанализированных и систематизированных автором фактических данных на основе исследований 4730 клинических штамма грибов и 15823 образцов клинического материала от 7683 больных туберкулезом.

Научный материал обработан с использованием адекватных методов статистической обработки различных количественных и качественных показателей, что подтверждает значимость и достоверность полученных результатов.

Результаты исследований доложены и обсуждены на 22 конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. Основное содержание работы достаточно полно отражено в 73 печатных работах, в том числе в 20 статьях в рецензируемых изданиях, 3 методических рекомендациях Департамента здравоохранения города Москвы.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа А.Б. Кулько построена по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, включающего 414 источников, из которых 146 отечественных и 268 иностранных, и приложений. Текст диссертации изложен на 374 страницах машинописного текста и содержит 61 таблицу и 70 рисунков.

Во введении раскрывается актуальность темы исследования и степень ее разработанности, представлены цель, задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные

положения, выносимые на защиту. Диссертантом детально описаны использованные в работе микробиологические, иммунологические, молекулярно-генетические методы, методики и тест-системы; методика и схема исследования состава грибов в воздухе стационара; методы статистического анализа результатов.

Литературный обзор (глава 1) информативен, изложен на 68 страницах и содержит 11 сводных таблиц по составу и свойствам отдельных групп возбудителей пневмомикозов. В первом разделе обзора литературы автором систематизированы новые данные по составу, таксономии, систематике, номенклатуре, биологии, морфологии, чувствительности и устойчивости к антимикотикам грибов, описанных в качестве возбудителей бронхолегочных микозов и глубоких микозов с поражением легких. В двух последующих разделах изложены имеющиеся сведения о риске развития и распространенности вторичных пневмомикозов у пациентов фтизиатрических клиник; даны представления о современном состоянии лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов и сложностях проведения их верификации.

Во второй главе «Алгоритмы комплексной лабораторной диагностики микозов органов дыхания у больных туберкулезом легких и интерпретация результатов» изложены разработанные автором подходы к проведению лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом, которые включают схему проведения микробиологических исследований респираторного и хирургического биоматериалов, иммунологических и культуральных исследований крови; алгоритмы микробиологической диагностики пневмомикозов, обусловленных дрожжевыми и мицелиальными грибами; критерии интерпретации получаемых микробиологических и иммунологических данных. Глава проиллюстрирована микрофотографиями окрашенных и нативных препаратов для прямой микроскопии с элементами различных грибов в респираторном и хирургическом материале и

фотографиями роста колоний микромицетов на специальных средах для первичного выделения возбудителей микозов.

В третьей главе «Результаты выявления состава и таксономии вероятных возбудителей бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных туберкулезом» описаны видовой, таксономический состав, ключевые свойства и диагностические признаки болезнетворных грибов, обнаруженных у больных туберкулезом при диагностике бронхолегочных и диссеминированных микозов. Автором подробно охарактеризованы особенности клинических штаммов 67 видов грибов-оппортунистов – способность к росту *in vitro* при 35°C и 37°C, вариативность морфологических признаков и наличие плеоморфизма; исследованы молекулярно-генетические свойства 7 клинических и сапротрофных штаммов *Aspergillus sydowii*. В диагностическом материале на пневмомикоз были выявлены возбудители аспергиллеза (14 видов), кандидоза (14 видов), криптококкоза (3 вида), зигомикоза (3 вида), гиалогифомикоза (19 видов), феогифомикоза (8 видов), редких дрожжевых микозов (6 видов). Из посевов крови больных туберкулезом были выделены 4 вида грибов рода *Candida*, из посевов спинномозговой жидкости – возбудитель криптококкоза *Cryptococcus neoformans*. Глава проиллюстрирована микрофотографиями клинических штаммов дрожжевых и плесневых микромицетов, выделенных из различного биоматериала.

В четвертой главе «Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных дрожжевыми грибами» проанализированы многолетние данные по диагностике у больных туберкулезом кандидоза легких и кандидемии (микроскопические, культуральные исследования и результаты серодиагностики), криптококкоза легких и центральной нервной системы (микроскопические, культуральные исследования и результаты серодиагностики), редких дрожжевых микозов с поражением легких (микроскопические, культуральные исследования).

В пятой главе «Результаты применения алгоритмов лабораторной диагностики для верификации бронхолегочных инфекций, вызванных мицелиальными грибами» проанализированы данные по диагностике у больных туберкулезом аспергиллеза легких (микроскопические, культуральные исследования и результаты серодиагностики), бронхолегочных зигомикоза (микроскопические, культуральные исследования), гиалогифомикоза (микроскопические, культуральные исследования), феогифомикоза (микроскопические, культуральные исследования).

В шестой главе «Результаты определения чувствительности к противогрибковым препаратам дрожжевых и мицелиальных грибов, выделенных от больных туберкулезом» систематизированы данные скринингового исследования уровней чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов дрожжевых аскомицетовых грибов родов *Candida*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saprochaete*; дрожжевых базидиомицетовых грибов родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula*; плесневых аскомицетовых грибов рода *Aspergillus*. Диссертантом охарактеризована активность широко применяемых азольных производных, соединений группы эхинокандинов, амфотерицина В и флуцитозина в отношении возбудителей аспергиллеза (12 видов), кандидоза (14 видов), криптококкоза (2 вида), редких дрожжевых микозов (6 видов). Даны рекомендации по выбору лекарственных препаратов для лечения бронхолегочных микозов и кандидемии у больных туберкулезом и целесообразности проведения тестирования чувствительности к антимикотикам у различных возбудителей.

В седьмой главе «Результаты мониторинга присутствия оппортунистических грибов в воздухе противотуберкулезного стационара» приведены результаты мониторингового анализа видового состава и сезонной динамики грибного аэропланктона в воздухе лечебного стационара. Автором установлено, что в воздухе стационара постоянно присутствуют жизнеспособные зачатки возбудителей аспергиллеза, зигомикоза,

гиалогифомикоза, феогифомикоза, причем значительное число этих видов грибов было обнаружено у пациентов при диагностике пневмомикозов. Вместе с тем, с помощью статистического анализа было показано, что микобиота воздуха лечебного стационара значимо отличается от микобиоты, развивающейся у пациентов в дыхательных путях, в легочных и плевральных полостях.

В разделе «Заключение» автор обобщает и анализирует полученные результаты диссертационного исследования, дает оценку вероятной распространенности оппортунистических бронхолегочных и диссеминированных микозов различной этиологии у групп пациентов с фоновым туберкулезом и возможности их лекарственной терапии с учетом новых данных по активности антимикотиков против возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и редких дрожжевых инфекций.

Таким образом, диссертационная работа Кулько Александра Борисовича является завершенным научным исследованием, обладающим научной новизной, теоретической и практической значимостью.

Соответствие специальности

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

Принципиальных замечаний по диссертации нет.

Вопросы к автору:

1. Как следует интерпретировать полученные Вами обширные данные о наличии у части видов грибов, описанных в качестве возбудителей глубоких микозов, вариативной и даже низкой природной способности к росту при 37°C? В полной ли мере отражает способность штамма к росту на питательных средах при 37°C его возможности к

непосредственному развитию в организме человека? Является ли, по Вашему мнению, термотолерантность (способность к росту при 37°C) ключевым фактором вирулентности для некоторых редких возбудителей пневмомикозов и требует ли данный вопрос прицельного изучения?

2. Существует ли вероятность появления резистентных к препарату каспофунгин штаммов возбудителей кандидоза – с учетом полученных Вами данных *in vitro* о наличии у части штаммов *Candida krusei* (8,3%) вероятной устойчивости к данному препарату с МПК = 1 мкг/мл (при том, что установленный организацией CLSI диапазон для устойчивых к препарату штаммов *C. krusei* составляет ≥ 1 мкг/мл)?
3. Какие методики следует внедрять в повседневную практику медицинских лабораторий для повышения эффективности верификации криптококкоза легких, что особенно актуально для группы пациентов с ВИЧ-инфекцией и при развитии СПИД?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Кулько Александра Борисовича на тему «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика» является законченным научным трудом, в котором решена значимая научная проблема по выявлению состава возбудителей микозов бронхов, легких и плевры у больных туберкулезом, изучению свойств патогенных микромицетов и разработке комплекса эффективных методов лабораторной диагностики пневмомикозов, необходимого для проведения диагностических и мониторинговых исследований во фтизиатрической клинике, что имеет важное научно-практическое значение для микробиологии.

Диссертационная работа Александра Борисовича Кулько «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 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 от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 01 октября 2018 года № 1168), 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

Профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет),
Адрес 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д.2, стр.4,
Телефон. +7 (499) 248-01-81. E-mail: mусo.iасi@gmаil.com
доктор медицинских наук, профессор



Сергеев Алексей Юрьевич

Подпись доктора медицинских наук

Сергеева Алексея Юрьевича заверяю:

Ученый секретарь ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Минздрава России (Сеченовский Университет).

доктор медицинских наук, профессор



Воскресенская Ольга Николаевна

15.05.2020 г.