

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. ректора Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Тверской государственной медицинской академии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
доктор медицинских наук, профессор



А.Б. Давыдов

« 27 » марта 2020 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертационной работы Кулько Александра Борисовича на тему «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

#### Актуальность темы исследования

Наблюдаемый на протяжении нескольких десятилетий в стационарах разного профиля рост заболеваемости оппортунистическими микозами, особенно тяжелыми формами микотических инфекций глубокой локализации, послужил основанием для отнесения условно-патогенных грибов к распространенным и весьма опасным возбудителям внутрибольничных инфекций. У пациентов с фоновым туберкулезом легких, получающим длительное лечение комбинациями противотуберкулезных химиопрепаратов, в том числе антибиотиками широкого спектра действия и у больных хроническими формами туберкулеза с полостными образованиями в легких вероятно развитие вторичных пневмомикозов различной этиологии, весьма

трудно диагностируемых. Развитие бронхолегочных микозов сопряжено с риском серьезных осложнений и способно значительно осложнять течение туберкулезного процесса у пациентов фтизиатрических клиник.

Сложности работы лабораторной службы при проведении диагностики и подборе препаратов для лечения микозов с поражением легких связаны со значительным разнообразием грибов-оппортунистов – возбудителей глубоких микозов, различающихся по морфологическим свойствам, природной чувствительности к антимикотикам, общеупотребимым приемам и методикам их идентификации. К настоящему времени не определены и не оценены видовой состав и таксономическая принадлежность дрожжевых и мицелиальных грибов, способных колонизировать нижние дыхательные пути человека и вызывать поражения бронхов, легких и плевры. Не исследованы должным образом уровни чувствительности вероятных возбудителей пневмомикозов к современным антимикотикам; границы вариативности диагностических признаков – особенности морфологии, молекулярно-генетические свойства клинических штаммов данных условно-патогенных видов грибов; термотолерантность возбудителей оппортунистических пневмомикозов и иные физиологические свойства. Отсутствие достоверной информации о составе и свойствах возбудителей пневмомикозов, данных о распространенности бронхолегочных микозов среди различных групп пациентов, предрасположенных к развитию оппортунистических инфекций легких, в том числе у больных туберкулезом органов дыхания, объясняется недостаточной разработанностью исследовательских подходов к организации эффективной лабораторной диагностики в условиях рутинных исследований.

Таким образом, тема диссертационной работы Кулько Александра Борисовича, посвященная изучению состава и свойств возбудителей вторичных микозов бронхов и легких у больных туберкулезом, а также совершенствованию лабораторной диагностики оппортунистических пневмомикозов, является актуальной и представляет значительный научный и практический интерес.

## **Новизна, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна работы не вызывает сомнений, автором впервые установлен и описан видовой и таксономический состав оппортунистических дрожжевых и мицелиальных грибов, вызывающих поражения бронхов, легких и плевры, развивающихся в полостных образованиях в легких и плевральных полостях и колонизирующих нижние отделы дыхательных путей у больных туберкулезом.

Обнаруженная по участкам ITS1-5.8S-ITS2, D1/D2 28S рибосомальной ДНК генетическая гетерогенность клинических штаммов вида *Aspergillus sydowii* сочеталась с отличиями штаммов и на фенотипическом уровне, что убедительно свидетельствует о наличии высокой степени изменчивости у данного возбудителя аспергиллеза.

Использование в исследовательских целях для тестирования чувствительности грибов стандартизованного метода микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением минимально подавляющих концентраций в мкг/мл позволило впервые определить уровни чувствительности к 10 современным противогрибковым препаратам из разных групп у выделенных от больных туберкулезом 12 условно-патогенных видов грибов рода *Aspergillus*. Проведенное автором скрининговое исследование активности современных системных антимикотиков в отношении плесневых грибов рода *Aspergillus* (12 видов) и дрожжевых грибов родов *Candida* (14 видов), *Cryptococcus* (2 вида), *Geotrichum* (1 вид), *Hanseniaspora* (1 вид), *Rhodotorula* (2 вида), *Saccharomyces* (1 вид), *Saprochaete* (1 вид) выявило среди возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и других дрожжевых микозов группу видов с вариативной или сниженной чувствительностью к отдельным широко применяемым в терапии глубоких микозов препаратам.

На основании полученного обширного фактического материала по значимости верификации вторичных пневмомикозов у больных

туберкулезом, автором доказана необходимость проведения во фтизиатрической клинике и стандартизации этапов комплексного микологического мониторинга основных и редких оппортунистических микотических инфекций: аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза (муромикоза), гиамогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых микозов.

Выводы и рекомендации обоснованы и соответствуют результатам проведенных исследований.

### **Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки**

Диссертационная работа Кулько А.Б. выполнена в соответствии с тематикой и планом научно-исследовательской работы Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» в рамках комплексных тем научно-исследовательских работ научных программ Департамента здравоохранения города Москвы: «Совершенствование выявления, диагностики и лечения туберкулеза и микобактериозов, а также сопутствующих грибковых поражений у больных ВИЧ-инфекцией» (2014-2016 гг., номер государственной регистрации 01201457860); «Повышение эффективности диагностики, лечения и профилактики туберкулеза», подтема «Персонализированный подход к формированию терапии сопровождения и лечения сопутствующей патологии у больных туберкулезом» (2017-2019 гг., номер государственной регистрации АААА-А18-118022190079-8).

### **Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации**

Теоретическая значимость работы состоит в том, что на основании результатов многолетнего скринингового исследования свойств клинических штаммов условно-патогенных грибов удалось существенно дополнить и уточнить имеющиеся описания отдельных видов и групп грибов-

оппортунистов данными по их природной чувствительности к современным системным лекарственным препаратам и группам антимикотиков (изучены 34 вида грибов из отделов *Ascomycota*, *Basidiomycota*), а также сведениями о наличии у них термотолерантности (исследованы 67 видов грибов из отделов *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* на способность к росту при 37°C – как фактор вирулентности для возбудителей глубоких инфекций и 35°C).

Работа имеет несомненную практическую значимость. Разработаны адаптированные для практических лабораторий схема проведения комплексной лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом органов дыхания, стандартизованные алгоритмы микробиологической диагностики плесневых и дрожжевых пневмомикозов, унифицированные критерии интерпретации получаемых лабораторных данных. Разработаны рекомендации по целесообразности проведения тестирования чувствительности к антимикотикам у возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и редких дрожжевых инфекций, в зависимости от установленного уровня их исходной чувствительности к препаратам. Для широкого применения на практике разработаны: схема быстрого разделения штаммов возбудителей пневмомикозов на группы, упрощающая идентификацию и позволяющая дифференцировать группы возбудителей с разными уровнями чувствительности к антимикотикам; модифицированная методика приготовления споровой суспензии культур возбудителей аспергиллеза, повышающая безопасность проведения тестирования чувствительности к антимикотикам мицелиальных грибов и достоверность получаемых результатов.

Созданная коллекция клинических штаммов оппортунистических дрожжевых и мицелиальных грибов была использована в работе в научных и практических целях: для исследования генетических особенностей *Aspergillus sydowii* и оценки перспектив использования молекулярно-генетических методов при видовой идентификации трудно распознаваемых по морфологии возбудителей аспергиллеза; для обнаружения

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

Разработанные и утвержденные Департаментом здравоохранения города Москвы методические рекомендации регионального уровня «Лабораторная диагностика бронхолегочных микозов у больных туберкулезом», «Лабораторная диагностика легочных микозов во фтизиатрической клинике» и опубликованная авторская монография «Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций» могут быть использованы в практических лабораториях противотуберкулезных клиник при проведении у пациентов диагностики вторичных бронхолегочных микозов.

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

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и подтверждается большим объемом исследований с применением комплекса общепринятых и адекватных микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических методов для решения поставленных задач; использованием современных методов статистической обработки количественных и качественных показателей; получением данных, сопоставимых с данными научной литературы.

Основные результаты диссертационной работы и ее научно-практическое значение достаточно полно отражены в опубликованных 73 печатных работах, в том числе в 20 статьях в рецензируемых изданиях, 1 авторской монографии, аннотированной в научных изданиях, включая рецензируемое, 3 методических рекомендациях. Материалы исследований доложены и обсуждены на 22 российских и международных конгрессах, съездах и конференциях различного уровня.

## **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Предложенные научно обоснованные подходы к организации комплексной лабораторной диагностики пневмомикозов у больных туберкулезом органов дыхания могут быть рекомендованы для активного внедрения в практику медицинских лабораторий фтизиатрических и других медицинских организаций при проведении диагностики и дифференциальной диагностики оппортунистических бронхолегочных микозов и глубоких микозов с поражением легких – аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза, зигомикоза, гиалогифомикоза, феогифомикоза, редких дрожжевых микозов. При обнаружении в посеве диагностического материала вероятного возбудителя пневмомикоза целесообразно использовать впервые разработанную и адаптированную для рутинной лабораторной практики схему разделения возбудителей пневмомикозов на группы, основанную на использовании простых морфологических и биохимических признаков. Результаты исследования активности *in vitro* широко применяемых в клинике противогрибковых препаратов в отношении возбудителей аспергиллеза, кандидоза, криптококкоза и редких дрожжевых инфекций могут быть использованы при выборе препаратов для антифунгальной терапии. В настоящее время разработанные автором подходы к лабораторной диагностике пневмомикозов у больных туберкулезом внедрены в работу централизованной бактериологической лаборатории и клинических подразделений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (акт внедрения от 24.10.2019 г.).

Разработанный в работе протокол исследования при работе с культурами дрожжевых, дрожжеподобных и мицелиальных условно-патогенных грибов можно рекомендовать для научно-исследовательской работы в области медицинской микологии и получения достоверных

сведений о свойствах различных возбудителей глубоких микозов. Для надежной идентификации редких и трудно распознаваемых по фенотипическим морфологическим свойствам возбудителей аспергиллеза легких целесообразно дополнительно исследовать их молекулярно-генетические свойства, проводя анализ нуклеотидных последовательностей регионов ITS1-5.8S-ITS2, D1/D2 28S рДНК.

Коллекция клинических штаммов дрожжевых, дрожжеподобных и мицелиальных грибов может быть использована для дальнейшего подробного изучения фенотипических и молекулярно-генетических свойств оппортунистических микромицетов, а также для поиска и тестирования новых антифунгальных препаратов, обладающих активностью в отношении возбудителей оппортунистических глубоких микозов.

Результаты диссертационного исследования Кулько А.Б. могут быть использованы в преподавании курсов микробиологии и микологии при чтении лекционного материала и проведении практических занятий в учреждениях высшего профессионального образования и учебных программах последиplomного дополнительного образования специалистов по лабораторной диагностике, врачей-фтизиатров, врачей-пульмонологов. В настоящее время материалы диссертации используются в программе дополнительного профессионального образования повышения квалификации для врачей на базе Негосударственного образовательного частного учреждения дополнительного профессионального образования «Высшая медицинская школа» (Москва) (<https://youtu.be/V8T9USG3Bn4>) и в специализированных лекционных курсах на факультете почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (акт внедрения от 18.10.2019 г.).

### **Оценка содержания и оформления диссертации**

Материалы диссертации изложены на 374 страницах машинописного текста. Диссертация написана грамотным научным языком и состоит из введения с подразделом «Методология и методы исследования», обзора



литературы, шести глав собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы, включающим в себя 414 работ, из них 146 отечественных и 268 зарубежных источников и приложения. Работа иллюстрирована 61 таблицей, 70 рисунками, включая 60 авторских фотографий, 2 приложениями.

Замечаний по работе нет.


### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Александра Борисовича Кулько на тему «Бронхолегочные микозы у больных туберкулезом: состав и свойства возбудителей, лабораторная диагностика» является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований, а также теоретических и научно-практических разработок осуществлено решение актуальной научной проблемы по выявлению состава и важнейших свойств возбудителей оппортунистических бронхолегочных и диссеминированных микозов у больных туберкулезом и разработке диагностического комплекса необходимых лабораторных методик для исследования проблематики вторичных пневмомикозов во фтизиатрической клинике, имеющей 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 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 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.

Отзыв на диссертационную работу Кулько А.Б. заслушан и одобрен на заседании кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России (протокол № 6 от 26 марта 2020 года).

Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор  Червинцев Вячеслав Михайлович

Адрес 170100, г. Тверь, ул. Советская, д.4  
Тел. +7 (4822) 32-17-79, e-mail: info@tvigma.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Червинца Вячеслава Михайловича заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
кандидат биологических наук, доцент Шестакова Валерия Геннадьевна

Подпись удостоверяю  
Ученый секретарь Ученого совета  
ФГБОУ ВО Тверской ГМУ  
Минздрава России

(доцент В.Г. Шестакова)

