

ОТЗЫВ
официального оппонента - доктора медицинских наук, профессора
Дерябина Дмитрия Геннадьевича
на диссертацию Родченко Юлии Валерьевны
на тему: «Грибы *Malassezia furfur* у новорожденных отделений хирургии,
реанимации и интенсивной терапии:
оптимизация микробиологической диагностики»,
представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских
наук по специальности 03.02.03. - микробиология.

Актуальность темы диссертации

Микроскопические грибы вида *Malassezia furfur* (ранее - *Pityrosporum ovale*) впервые были писаны уже более 150 лет назад, однако, в силу особенностей физиологии и определяемых этим сложностей культивирования стали предметом углубленного клинического исследования только в последней четверти XX века. В частности, уникальной особенностью *M. furfur* является их липид-зависимость, обуславливающая необходимость наличия в среде культивирования жирных кислот из 12-14 атомов углерода, а также иные, до конца не охарактеризованные потребности, являющиеся причиной очень медленного роста данных микроскопических грибов в лабораторной культуре.

Первоначальные представления о клинической значимости *M. furfur* были связаны с его участием в развитии себореи и себорейного дерматита, а в дальнейшем были расширены за счет доказательства роли данного микроскопического гриба в этиологии отрубевидного (разноцветного) лишая и некоторых других дерматологических заболеваний. Современные исследования направлены на изучение *M. furfur* при катетер-ассоциированной фунгемии и инвазивных микозах у иммуносупрессированных пациентов. Ряд исследователей предлагает выделить обозначенные выше заболевания в отдельную группу «малассезиозов».

В то же время значимость *M. furfur* как госпитальных патогенов в неонатологии остаётся все ещё недооценённой, что свидетельствует об актуальности диссертационной работы Родченко Ю.В., целью которого стало совершенствование микробиологической диагностики и профилактики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur* у новорождённых детей отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации и автореферате

Сформулированные Родченко Ю.В. научные положения, раскрывающие их содержание выводы и логически следующие за ними практические рекомендации, базируются на обширном экспериментально и клиническом материале и хорошо обоснованы.

Диссидентом убедительно доказывается этиологическое значение *M. furfur* в развитии и течении инфекционного процесса у новорождённых детей отделений реанимации. Проведен анализ информативности различных методов выявления *M. furfur*, по результатам которого усовершенствован культуральный метод выделения данного микроскопического гриба, дополнена база его возможных масс-спектров, а также показана высокая эффективность ПЦР с родоспецифическими праймерами для детекции грибов рода *Malassezia* и видоспецифическими праймерами для детекции *M. furfur*. Итогом исследования явилась разработка программы микробиологического мониторинга *M. furfur* как важного элемента профилактики грибковых инфекций в отделениях реанимации новорождённых.

Возможно замечание связано с формулировкой «разработана и апробирована комплексная диагностическая ПЦР тест система для идентификации дрожжевых грибов» (Положение 2). В тексте диссертации отсутствуют данные о разработке данной тест системы, не приводятся последовательности праймеров и гидролизуемых флуоресцентных зондов. Из текста диссертации (стр. 71) следует, что речь скорее должна идти об участии автора в коллективе исследователей, совместно с Институтом репродуктивной

генетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор, профессор РАН, д.б.н. Трофимов Д.Ю.), разработавших экспериментальную комплексную тест-панель «МикозоСкрин», основанную на методе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени и позволяющую одновременно идентифицировать грибы 14 различных таксонов. При этом вероятная роль диссертанта определялась апробацией данной системы для ПЦР-детекции *M. furfur*. Одновременно следует указать, что соответствующие формулировки Вывода 3 «... использование комплексной диагностической тест-системы, основанной на методе количественной ПЦР для идентификации дрожжевых грибов...» и Вывода 7 «...внедрение ПЦР метода с использованием тест-системы «МикозоСкрин» ...» представляются корректными и полностью обосновываются материалами диссертации.

В целом качество представления результатов и их научная трактовка не оставляют поводов для сомнений в высокой степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций диссертации.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, обоснованности, сформулированных в диссертации и автореферате

Несомненным достоинством диссертации является то, что она выполнена с использованием исключительно обширного клинического материала: проведено микробиологическое обследование 4008 новорождённых: в том числе 65% ($n=2604$), находящихся на лечении в Отделении реанимации и интенсивной терапии и 35% ($n=1404$) в Отделении хирургии, реанимации и интенсивной терапии. В общей сложности проанализированы посевы 24662 проб, из них 19532 – со слизистых оболочек ЖКТ и 5130 из клинически значимых локусов (зев, кровь, моча, отделяемое конъюнктивы и др.). Также проанализированы посевы 555 проб аутопсийного материала от 147 умерших пациентов отделения ОРИТН ($n=61$) и ОХРИТН ($n=86$).

Основные результаты исследования представлены в 15 печатных работах, в том числе 6 статьях в рецензируемых научных журналах (1 из них – в журнале, индексируемом в базе Scopus), рекомендуемых ВАК Министерства

науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования результатов диссертационных исследований. Результаты работы достаточно полно представлены на многочисленных российских и международных форумах и конгрессах.

Научная новизна полученных результатов

Первый важный элемент новизны оппонируемой диссертации определяется совокупностью новых данных, доказывающих клиническую значимость *M. furfur* в неонатологии. Отмечена высокая высеиваемость *M. furfur* - 76% от всех выделенных грибов (1365/1808), при этом *M. furfur* выявлена у 9,7% обследованных детей (387/4008). Диссеминация подтверждена у 25-38,5% новорождённых с положительными результатами исследования, при этом чаще всего она наблюдалась на фоне колонизации ЖКТ. Кроме того, соискателем показано, что очень низкая и экстремально низкая масса тела при рождении и оперативные вмешательства являются важными факторами риска развития системных микозов, вызванных *M. furfur*.

Второй элемент новизны связан с совершенствованием подходов к выделению и идентификации *M. furfur*. На основании исследования чувствительности микроскопических грибов к различным антимикотическим препаратам предложена добавка к питательной среде Диксона (mDixon), содержащая флуконазол в концентрации 32 мг/л и впервые сообщающая подобным средам свойство селективности (обеспечение преимущественного роста *M. furfur* при подавлении роста дрожжевых грибов *C.albicans* и *Candida non-albicans*). Приоритет данной разработки подтвержден заявлкой на патент РФ № 2020116304 от 29 апреля 2020 года. Отдельно следует отметить, что полученный результат хорошо корреспондирует с наблюдениями об изменении видового состава дрожжевых грибов, выделяемых у новорождённых ОРИТН И ОХРИТН на фоне широкого профилактического применения флуконазола и эхинокандинов, что может определять селекцию *M. furfur* в условиях медицинского стационара.

Третьим элементом новизны представляется создание оригинальной коллекции штаммов *M. furfur*, выделенных из клинического материала новорождённых и медицинского персонала. При этом один из них – *M. furfur* Y147 детально охарактеризован и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, РАН (Московская обл., г. Пущино) (Номер заявки 191-2-02.1-2181 от 04.03.2020 года). Полученный результат формирует хороший задел для создания на базе данной коллекции референсной лаборатории по диагностике малассезиозов, решающей широкий круг фундаментальных и прикладных вопросов соответствующей направленности.

Практическая значимость исследования

Полученные в ходе исследований результаты явились основанием для оптимизации диагностики, профилактики и лечения инфекций, вызванных *M. furfur*. Результаты диссертационного исследования использованы при разработке нормативного документа «Клинические рекомендации. Неонатология» (М.: "ГЭОТАР-Медиа", 2019), подготовленного коллективом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России при участии диссертанта.

Внедрение результатов работы

Результаты проведенного исследования и разработанные на его основе рекомендации отражены в алгоритме микробиологического мониторинга, диагностики и профилактики инфекций, вызванных дрожжевыми грибами *M. furfur* у новорождённых, находящихся на выхаживании в отделениях хирургии, реанимации и интенсивной терапии и внедренном, в практику стационара 3-го уровня (утверждён заместителем директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России).

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа состоит из введения и 5 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных

исследований, заключения, списка используемой литературы, выводов, приложений. Работа изложена на 137 страницах текста компьютерного набора, иллюстрирована 26 таблицами, 18 рисунками и 4 приложениями. Указатель литературы включает 45 отечественных и 54 зарубежных источников.

Представленные во введении формулировки актуальности, цели, задач, выносимых на защиту положений, научной новизны и практической значимости работы не вызывают возражений.

В трёх разделах обзора литературы анализируются современные данные о *M.furfur*, каждый из них завершается констатацией круга нерешённых вопросов, в том числе решаемых автором при выполнении настоящей работы.

Выбранные методы и методология работы изложены достаточно логично и полностью соответствуют цели и задачам диссертации.

Результаты собственных исследований, изложенные в трёх главах, написаны в хорошем научном стиле. Обсуждение и интерпретация результатов исследования выполнены на достаточном научном уровне, свидетельствующем о профессионализме и квалификации докторанта как сложившегося учёного.

В качестве замечания к оформлению диссертации следует указать на недостаточное качество исполнения рисунков 3, 4, 5, 8, 9 и 10, представляющих собой плохо читаемые фотографии документов или снимки с экрана низкого качества. Рисунки 4 и 8 дублируют друг друга.

Кроме того, не до конца понятным оказалось обозначение единственного представленного в диссертации сиквенса (стр. 101), указанного как 147_IT5. Вероятно, приведенная нуклеотидная последовательность является фрагментом внутреннего транскрибуируемого спейсера (англ. - internal transcribed spacer; ITS), расположенного между генами малой и большой субъединиц рибосомы, хотя ранее автор сообщает о проведении секвенирования «последовательности нетранскрибуемых межгенных спейсеров ITS1/ITS2 и фрагмента D1/D2 гена для большой рибосомальной субъединицы 26SpPHK» (стр. 54-55).

Автореферат отражает основное содержание диссертации. В качестве замечания следует указать, что анализ чувствительности *M. furfur* к

антисептикам (стр. 42, 52-53, 79-81 диссертации) в автореферате не представлен.

Приведенные замечания не влияют на общую положительную оценку работы; принципиальных замечаний по оппонируемой диссертации нет.

В процессе её защиты хотелось бы получить ответы автора на следующие вопросы:

1) Для признания микроорганизма возбудителем определенного инфекционного заболевания традиционно используется т.н. «триада Коха». Существуют ли подобные доказательства для грибов *M. furfur* применительно к инфекциям новорожденных?

2) В диссертации указывается: «результаты микробиологических исследований инфекций, вызванных *M. furfur*, чаще всего не находили отражения в клиническом или патологоанатомическом диагнозе». Как в настоящее время отражается этиологическая роль *M. furfur* у новорождённых, находящихся на лечении в ОРИТН и ОХРИТН?

Заключение

Диссертация Родченко Юлии Валерьевны на тему «Грибы *Malassezia furfur* у новорожденных отделений хирургии, реанимации и интенсивной терапии: оптимизация микробиологической диагностики», выполненная в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, является законченным научно-квалифицированным трудом, содержащим решение важной научной задачи – усовершенствование микробиологической диагностики и профилактики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur*, в неонатологии.

Диссертация не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации и полностью соответствует требованиям п. 16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном

автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденным приказом ректора Сеченовского Университета от 31.01.2020 г. №0094/P, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук (03.00.07-микробиология), профессор, ведущий научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России

Д.Г.Дерябин

Москва, ул. Короленко, д.3, стр.6.

Телефон: +7 903 221 39 63; E-mail: dgderyabin@yandex.ru

Подпись д.м.н., профессора Дерябина Д.Г. заверяю,
заместитель директора по научной работе ФГБУ «Государственный научный
центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России,
доктор биологических наук



В.С. Соломка

Москва, ул. Короленко, д.3, стр.6. Телефон: (499) 785 20-40

«15» 01 2021 года