ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Багировой Наталии Сергеевны, на диссертационную работу Родченко Юлии Валериевны 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

Диссертационная работа посвящена изучению возможностей усовершенствования микробиологической диагностики и профилактики грибковых инфекций, вызванных *Malassezia furfur* у новорождённых детей отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля. Анализ международных данных в отношении инвазивных грибковых инфекций из отчетов по аутопсиям показывает, что несмотря на все наши усилия по профилактике, диагностике и лечению, инвазивные микозы все еще имеют значительную распространенность и связаны с низким уровнем прижизненной диагностики. [Dignani M.C., 2014]. Существует мало систематических данных о частоте инвазивных инфекций, обусловленных грибами рода *Malassezia* у пациентов с ослабленным иммунитетом, которые предоставляют информацию об общей клинической значимости этой оппортунистической инфекции. *Malassezia spp.* могут быть выделены с кожи 3% здоровых новорожденных, а 28% детей в отделении интенсивной терапии по данным зарубежной литературы колонизированы уже в течение первой недели жизни, и 30–64% госпитализированных недоношенных детей становятся колонизированными на второй неделе жизни [Athanasios Tragiannidis с соавт., 2009]. Дети становятся колонизированными при контакте кожи с родителями или работниками здравоохранения, которые могут далее передавать микроорганизм от зараженного или колонизированного младенца другим людям через руки. В

то время как колонизация и наличие внутрисосудистых устройств, по-видимому, являются обязательными предпосылками для фунгемии, введение парентеральных липидов может выступать в качестве фактора риска. Поскольку *Malassezia spp.* представляют собой необычную причину инвазивных микозов, для диагностики инфекции от врачей требуется высокий индекс подозрительности. Принимая это во внимание, становится очевидным необходимость и важность определение оптимального способа проведения микробиологического мониторинга колонизации и грибковых инфекций у новорождённых в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Значение *M. furfur* как возбудителя тяжелых внутрибольничных инвазивных микозов остаётся во многом недооцененным из-за сложности микробиологической диагностики этих инфекций. *M. furfur* практически не культивируется на обычно применяемых искусственных питательных средах. Причина заключается в особенностях метаболизма – для поддержания жизнедеятельности *M. furfur* необходимы липиды. Кроме того, требуется значительное время для выращивания *Malassezia spp.* (до 5-ти дней и более). Поэтому использование молекулярных диагностических методов является привлекательным, но осложняется отсутствием необходимых сертифицированных и зарегистрированных тест-систем для быстрой и надежной диагностики подобных микозов. В связи с этим научная проблема, сформулированная в диссертации Родченко Юлии Валериевны, является важной и актуальной.

Научная новизна

В рамках данной работы впервые проведена комплексная сравнительная оценка различных микробиологических методов диагностики грибковых инфекций, вызванных *M.furfur* и показаны преимущества и недостатки каждого из них.

Впервые в России разработана тест-панель, основанная на методе количественной ПЦР для идентификации дрожжевых грибов, включающая

праймеры для видовой идентификации грибов рода *Malassezia*, в том числе вида *M. furfur* (РУ № РЗН 2020/11088 от 06.07. 2020 года).

Впервые в России создана и охарактеризована коллекция штаммов *M. furfur*, выделенных из клинического материала новорождённых и медицинского персонала. Штамм *Malassezia furfur Y147* депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, РАН (Московская обл., г. Пущино) (Номер заявки 191-2-02.1-2181от 04.03.2020 года).

В рамках данного научного исследования разработана и внедрена в практическое здравоохранение селективная питательная среда для выделения *M. furfur* (Заявка на патент № 2020116304 от 29. 04. 2020 года).

В работе Родченко Юлии Валериевны экспериментально, на средах разработанных с учётом питательных особенностей гриба, изучена чувствительность клинических изолятов *M. furfur* к антифунгальным препаратам.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационной работы Родченко Юлии Валерьевны не вызывает сомнений и обеспечивается проведением исследовательских работ с использованием новейших методологических подходов, базирующихся на анализе современной научной литературы; использованием широкого спектра современных микробиологических и молекулярных методов исследования; объемом и репрезентативностью исследований. Фактический материал проанализирован с использованием адекватных методов статистической обработки количественных показателей, что подтверждает значимость и достоверность полученных результатов.

Автором были в полной мере решены поставленные задачи, соответствующие означенной цели, что отражено в обоснованных выводах

исследования. Полученные результаты согласуются с современной научной литературой в данной области, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов. Представленные в диссертационной работе научные положения, выводы и практические рекомендации четко и ясно сформулированы, логически вытекают из результатов исследований, проведенных автором.

Теоретическая и практическая значимость работы

Автором получена и структурирована важная информация по эпидемиологическим и клиническим особенностям колонизации *M. furfur* новорождённых отделений реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля. Материалы исследования и рекомендации нашли отражение в разработанном 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).

В результате проведенных исследований в рамках диссертационной работы предложена для внедрения в практику клинической микробиологии модифицированная селективная питательная среда для выделения грибов *M. furfur*.

Кроме того, показана недостаточная эффективность существующих и применяемых в практической работе методов идентификации дрожжевых грибов *M.furfur* и доказана целесообразность использования разработанной и апробированной комплексной диагностической тест-панели, основанной на методе количественной ПЦР, для идентификации дрожжевых грибов, в состав которой входят родоспецифические праймеры для детекции грибов рода *Malassezia* и видоспецифические праймеры для детекции *M. furfur* с целью быстрой диагностики грибковых инфекций у новорождённых.

Собранная и охарактеризованная коллекция дрожжевых грибов *M. furfur* безусловно имеет практическое и теоретическое значение, так как может быть применена в дальнейших научных исследованиях, а первый депонированный отечественный штамм *M. furfur Y147* рекомендуется использовать как контрольный штамм при производстве питательных сред и контроле качества микробиологических исследований.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Результаты исследований доложены и обсуждены на 12-ти конгрессах и конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. Основное содержание работы достаточно полно отражено в опубликованных по теме диссертации 15-ти научных работах, в том числе 6-ти статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (1 из них – в журнале, индексируемом в базе Scopus), 1 – заявка на патент РФ на изобретение.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Автор качественно оформил и проиллюстрировал свою диссертацию с учетом современных требований, работа содержит все необходимые разделы. Диссертационная работа Родченко Юлии Валерьевны изложена по традиционному плану на 136 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26-ю таблицами, 18-ю рисунками и 4-мя приложениями. В списке литературы приведены 44 отечественных и 54 зарубежных источника. Диссертационная работа включает введение и 5 глав: обзор литературы, материалы и методы, 3 главы собственных результатов, а также разделы обсуждение, практические рекомендации, список сокращений, список литературы и 4 приложения.

В разделе «**Введение**» автором обоснована актуальность исследования и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту, описан личный вклад автора в выполнение исследования, обоснована достоверность результатов.

В главе «**Материалы и методы**» подробно описаны использованные в работе методики проведенных исследований – микробиологические (изучение культуральных свойств, идентификация, определение чувствительности к антибиотикам), молекулярные, статистические методы. Показан объем исследований, проведенных на различных этапах работы. Материалы этой главы показывают широкий диапазон современных экспериментальных методик, освоенных автором диссертации.

Глава **«Обзор литературы»** включает анализ отечественных и иностранных научных публикаций, посвященных теме исследования. Автор представил современные данные по теме диссертационной работы.

Результаты собственных исследований представлены 3-мя главами.

В **главе 3** описаны результаты ретроспективного анализа эпидемиологических и клинических особенностей колонизации *M. furfur* новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля с 2000 по 2018 гг. Установлена возможная связь частоты и видового состава грибов, колонизирующих слизистую полости рта и кишечника новорождённых в процессе госпитализации, а также изолятов, выделенных у новорождённых за 2015-2018 годы из различных локусов при подозрении на диссеминацию грибковой инфекции с особенностями клинического статуса, выхаживания и лечения новорождённых. На Рисунке 6 показана динамика видового состава дрожжевых грибов, выделенных у новорождённых. **В связи с этим вопрос Юлии Валериевне: с какого времени в данном стационаре прицельно стали применять питательную среду для выделения *M. furfur*, с 2012?**

Предполагаете ли Вы, что грибы *M. furfur* теоретически могли и ранее составлять значительную долю в структуре дрожжевых грибов, выделяемых у новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, или Вы связываете появление нового грибкового возбудителя с введением в практику применение эхинокандинов, к которым данный вид грибов нечувствителен?

В рамках диссертационной работы проанализированы результаты исследований 555 аутопсийных материалов, полученных от 147 умерших детей с различной соматической патологией и развитием инфекции в период с 2015 по 2018 годы. *M. furfur* выделена в 6 случаях, причем ни в одном из них диагноз инвазивной грибковой инфекции не звучал, что еще раз подтверждает важность и необходимость проведенных Юлией Валерьевной исследований.

Несмотря на безусловную привлекательность данной работы, положения, изложенные автором не всегда имеют четкую и ясную форму, не обошлось и без грамматических и стилистических ошибок, опечаток. Так, в Таблице 5 «Частота выделения *M. furfur* у новорождённых в период с 2015 по 2018 годы» допущена опечатка: в итоговой графе написано «1215/57,7», тогда как доля положительных результатов в 2018 г. составила 7,7%, а не 57,7%. Кроме того, единицы измерения МИК означены то в мкг/мл, то в мг/л, хотя лучше использовать единообразные обозначения.

Согласно данным Таблицы 5, частота выделения *M. furfur* у новорождённых в отделениях реанимации на протяжении четырёх анализируемых лет оставалась относительно постоянной и составляла около 10%. При этом в ОРИТН частота выявления *M.furfur* была с тенденцией к нарастанию, тогда как в ОХРИТН в первые три года наблюдения этот показатель был в 2,5 и более раз выше. **В связи с этим вопрос к Юлии Валериевне: как Вы считаете, чем можно объяснить различия в частоте выделения *M. furfur* в этих двух отделениях?**

В ходе исследования было установлено, что более чем у половины новорождённых отмечалась только колонизация слизистых оболочек без признаков развития инвазивного микоза, а микробиологически подтвержденная инфекция установлена только у 25-38,5% новорождённых, при этом чаще всего она наблюдалась на фоне колонизации слизистых желудочно-кишечного тракта, что согласуется с данными зарубежных исследователей. Поскольку известно, что дети становятся колонизированными при контакте кожи с родителями или работниками здравоохранения, которые могут далее передавать микроорганизм от зараженного или колонизированного младенца другим людям через руки, целесообразность проведения обследования медицинского персонала отделений на носительство *M. furfur* вполне обоснована. Обследовано 65 сотрудников, из них 22 сотрудника отделения ОХРИТН и 43 сотрудника ОРИТН. У 4,6% сотрудников выявлена колонизация кожи *M. furfur.*

В главе 3 также изложены результаты сравнительного анализа различных методов идентификации грибов *M.furfur* (биохимический, масс-спектрометрический и молекулярно-генетический), что имеет прямое практическое значение, поскольку этот анализ ориентирует врачей-микробиологов относительно достоверности тех или иных методов диагностики. Проведенный сравнительный анализ методов идентификации является сильной стороной диссертационной работы Родченко Юлии Валерьевны. **Вопрос диссертанту**: **почему при сравнительном анализе различных методов идентификации грибов *M. furfur* была столь малая выборка – 50 штаммов для идентификации на анализаторе VTEK 2 Compact 30 и на *MALDI-TOF* – а не все 412 штаммов. Возможно, при идентификации всех полученных в ходе работы штаммов доля адекватной идентификации была бы выше?** База *MALDI-TOF* постоянно обновляется, и, возможно, последний ее вариант с более широким спектром идентифицируемых грибов даст более обнадеживающие результаты? Собранная Вами коллекция открывает возможность проверки новой базы

MALDI-TOF. Юлия Валериевна Родченко доказала преимущества тест-панели, разработанной совместно с другими учеными, основанной на методе количественной ПЦР, для идентификации дрожжевых грибов, включающая праймеры для видовой идентификации грибов рода *Malassezia*, в том числе вида *M. furfur*. Идентифкация молекулярно-генетическими методами (количественной ПЦР) с использованием ПЦР панели «МикозоСкрин» может проводиться непосредственно из биологического материала пациентов, что очень важно для ускорения выдачи окончательного ответа. Разработка данной панели является весьма ценной для практики.

В рамках диссертационной работы была поставлена задача определить и проанализировать чувствительность выделенных изолятов *M. furfur* к антифунгальным препаратам, которая выходила за рамки поставленной цели. В итоге были представлены результаты анализа чувствительности *in vitro* к антифунгальным препаратам и антисептикам клинических штаммов *M. furfur*, причем были протестированы только 15-30 штаммов. **Вопросы диссертанту: почему так мало штаммов протестировано? Чем Вы объясните резкие различия в полученных значениях МПК для амфотерицина** (согласно Таблицам 12 и 13) **на среде Мюллер-Хинтона и на среде PRMI 1640 методом Е-тестов?** Далее, Вами была проведена работа по определению МИК амфотерицина В, каспофунгина, флуконазола и микофунгина методом серийных разведений в микропланшетах с использованием чистых субстанций антимикотиков на среде PRMI 1640. При оценке Вами результатов обнаружен рост *M. furfur* во всех лунках, в связи с чем интерпретация полученных данных не представлялась возможной. **Объясните, пожалуйста, в чем состояла неудача и почему Вы не сделали попытки повторить опыт (по крайней мере, в тексте диссертации это не отражено)?** Поскольку все существующие нормативные документы (EUCAST, CLSI, российские клинические рекомендации 2018 года) не содержат критериев оценки получаемых значений МИК антифунгальных препаратов для *M. furfur*, категоризация чувствительности/устойчивости

этого возбудителя в настоящее время невозможна, но единственный метод, который целесообразно было бы применить в данной ситуации, это как раз метод серийных разведений, причем при тестировании всех 412 штаммов Вашей коллекции. В этом случае полученные данные представляли бы собой интересные результаты, которые можно добавить к результатам других исследователей и использовать при разработке критериев оценки МИК, особенно если они проводились с параллельной оценкой клинической эффективности антифунгальных препаратов. Поскольку полученные Вами данные носят противоречивый и не вполне ясный характер, эту часть работы не стоило освящать в рамках данной диссертационной работы. Диссертант допускает смысловые ошибки при изложении сути, например, написано следующее: «..все изоляты грибов рода *Candida* имели МИК менее 32 мг/л». Штаммы *Candida spp.* не имеют МИК. Термин минимальная ингибирующая концентрация относится именно к антимикробному препарату. Следовало бы сформулировать примерно так: « МИК флуконазола для *Candida spp….».*

Юлия Валериевна исследовала в соответствии с Методическими указаниям МУ3.5.1.3439-17 антимикробное действие дезинфицирующих средств, используемых в ежедневной практике ОРИТН и ОХРИТН. Данный раздел работы вполне отвечает цели диссертационной работы по совершенствованию мер профилактики инвазивных грибковых инфекций, обусловленных в том числе и *M. furfur*. Полученные результаты позволяют выбрать для дезинфекции госпитальных объектов, для обработки рук медицинского персонала эффективные дезинфицирующие средства, и это сильная сторона диссертационной работы.

В главе собственных результатов описан алгоритм разработки селективной питательной среды для выделения грибов *M. furfur* из клинического материала. Среда разработана на основе модифицированного агара по прописи Диксона с добавлением флуконазола в качестве селективной добавки с целью подавления роста других дрожжевых грибов. В связи с этим было бы интересно получить данные по чувствительности *Candida spp.*,

выделяемых в ОРИТН и ОХРИТН, которые бы подтверждали целесообразность выбора флуконазола в качестве селективного элемента среды. Например, в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в ходе периодически проводимого мониторинга выявлена достаточно большая доля резистентных к флуконазолу штаммов *Candida spp*. [Багирова Н.С с соавторами, 2015 г, 2017 г.], и в таких обстоятельствах селективное свойство среды нивелируется. **Вопрос для Юлии Валериевны: почему Вы выбрали для этих целей именно флуконазол, а не, например, эхинокандины, к которым чаще всего либо не регистрируется устойчивость у *Candida spp*. и прочих дрожжевых грибов, либо она очень низкая, и к тому же, по литературным данным, терапия эхинокандинами инфекций, обусловленных *M. furfur*, неэффективна?**

При оформлении таблиц автор не всегда помещает пояснения, например, для Таблиц 15, 16, 18 и 20 – должны быть пояснения, что такое «+», «+++», «++++» или «(-), а в Таблице 22 – «0». При прочтении приходится искать объяснения в тексте.

Глава 4 посвящена описанию коллекции клинических штаммов *M. furfur*, на основании фенотипических и молекулярно-генетических свойств. Создана и охарактеризована коллекция, состоящая из 384 клинических штаммов *M. furfur,* выделенных у новорождённых и медицинского персонала, смывов из окружающей среды. Каждый штамм имеет свой микробиологический паспорт.

В главе 5 описан алгоритм микробиологического мониторинга и диагностики инфекций, вызванных *M. furfur*, у новорождённых, находящихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля. Микробиологический мониторинг включает в себя постоянное слежение за колонизацией новорождённых, для чего предлагается исследовать мазки из полости рта и кал новорожденных. Дети становятся колонизированными при контакте кожи с родителями или работниками здравоохранения, и далеко не у всех детей колонизация

распространяется на слизистые полости рта, желудочно-кишечного тракта. **Вопрос автору**: **почему не включили для исследования мазки с кожи?** Увеличение количества исследуемых локусов расширяет возможность выявления не только факта колонизации, но и ее массивности. В схеме алгоритма мониторинга первый шаг обозначен как «Клинические признаки грибковой инфекции: есть/нет». В то же время автор ранее в диссертации констатирует, что инвазивные грибковые инфекции не отличаются патогномоничными признаками. Поэтому было бы более правильно первый шаг обозначить, например, как «подозрение на инфекционное осложнение: да/нет». Юлия Валериевна предлагает проводить мониторинг по выявлению колонизации 1 раз в неделю. **Вопрос диссертанту**: **при планировании мониторинга следует учитывать имеющиеся у конкретного ребенка предпосылки, факторы риска развития инвазивного микоза, обусловленного *M. furfur* – каким образом? Какие факторы риска Вы считаете первостепенными?**

Далее автор предлагает алгоритм микробиологической диагностики *M. furfur*, в котором микроскопия собственно биоматериала вообще не рассматривается, хотя ее целесообразно проводить при поступлении любого биоматериала, за исключением, пожалуй, крови и кала. Микроскопия биоматериала очень часто является не только весьма информативным методом микробиологического исследования, но и экспресс-диагностикой, особенно при использовании иммунофлюоресцентной микроскопии с калькофлюор-белым.

Раздел **«Обсуждение результатов»** построено таким образом, что воспринимается скорее как расширенное изложение выводов из проведенной работы, тогда как более выигрышной является форма сравнительного анализа собственных результатов исследования с данными литературных источников.

Стиль и оформление работы не вызывают существенных замечаний, а замечания, отраженные в Отзыве, не носят принципиальный характер и не

умаляют научной и прктической значимости диссертации. Структура и логика изложения материалов диссертации выглядят достаточно обоснованными в контексте раскрытия поставленной цели и задач исследования. Цели и задачи исследования, сформулированные автором, были вполне достигнуты. Выводы диссертационного исследования Родченко Юлии Валерьевны логично вытекают из результатов проведенного исследования и полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Диссертация представляет определенный интерес не только для научного сообщества, но и для врачей-микробиологов, и для специалистов эпидемиологической службы, и для клиницистов.

Практические рекомендации изложены в 7-ми пунктах, они позволяют использовать данные автора в практической работе врачей-микробиологов, врачами лечебных учреждений, но пункты 2 и 3 было бы лучше объединить, так как они имеют смысловое сходство.

Вопрос диссертанту: сформулируйте, пожалуйста, возможные направления перспективы дальнейшей разработки темы.

Заключение

Диссертация Родченко Юлии Валериевны 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 под руководством д.м.н. Припутневич Т.В. и д.м.н. Зубковым В.В., является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи - усовершенствование микробиологической диагностики и профилактики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur* у новорождённых детей отделений

реанимации и интенсивной терапии, в том числе хирургического профиля, что 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 Сеченовского университета от 31.01.2020 г. №0094/Р, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Родченко Юлия Валериевна, заслуживает присвоения степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

старший научный сотрудник микробиологической лаборатории федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук (шифр специальности 14.01.12 – «онкология», 03.02.03 – «микробиология»)

115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 23; тел.: +7 (499) 324-18-60; E-mail: nbagirova@mail.ru

11.01.2021г

Подпись _____ /Багирова Наталия Сергеевна/

Подпись д.м.н., с.н.с. Багировой Н.С. заверяю
Ученый секретарь федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кандидат медицинских наук И.Ю. Кубасова

Подпись_____

115478, Москва, Каширское шоссе 24, тел. +7(499) 324-14-19