

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по  
научной работе ФГБУ «НМИЦ АГП  
им. В.И.Кулакова» Минздрава России

д.м.н., профессор  
Д.Н. Дегтярев

2020 г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» Минздрава России по диссертационной работе Родченко Юлии Валерьевны на тему «Грибы *Malassezia furfur* у новорожденных отделений хирургии, реанимации и интенсивной терапии: оптимизация микробиологической диагностики» представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

**Председатель:** академик РАН, д.м.н., профессор Серов В.Н.

**Секретарь:** д.м.н., профессор Баранов И.И.

**Присутствовали:** академик РАН, д.м.н., проф. Серов В.Н., д.м.н., проф. Баранов И.И., д.м.н., проф. Зубков В.В., д.м.н., проф. Пекарев О.Г., д.м.н., проф. Ходжаева З.С., д.м.н., проф. Пекарева Н.А., д.м.н., проф. Хилькевич Е.Г., д.м.н., проф. Щеголев А.И., д.м.н., проф. Рюмина И.И., д.м.н. Козаченко А.В., д.м.н. Байрамова Г.Р., д.м.н. Смольникова В.Ю., д.м.н. Припутневич Т.В., д.м.н. Перминова С.Г., д.м.н. Корнеева И.Е., д.м.н. Асатурова А.В., к.м.н. Ионов О.В., к.м.н. Подуровская Ю.Л., к.м.н. Козаченко И.Ф., к.м.н. Донников А.Е., к.м.н. Полушкина Е.С., к.м.н. Хашенка Е.П.

## **ПОВЕСТКА ДНЯ №27 от 07.09.2020**

Апробация кандидатской диссертации младшего научного сотрудника Центра Родченко Юлии Валериевны на тему «Грибы *Malassezia furfur* у новорожденных отделений хирургии, реанимации и интенсивной терапии: оптимизация микробиологической диагностики».

**Научные руководители:** д.м.н. Припутневич Т.В., д.м.н. проф. Зубков В.В.

**Шифр специальности:** 03.02.03 – микробиология

**Рецензенты:** к.м.н. Любасовская Л.А., к.м.н. Никитина И.В.

### **Актуальность**

Грибковые заболевания широко распространены среди пациентов со сниженным иммунитетом, в особенности у глубоко недоношенных новорождённых с очень низкой или экстремально низкой массой тела при рождении. Естественные обитатели кожных покровов, с которыми обычно ассоциированы грибковые заболевания кожи, стали выступать как внутрибольничные возбудители системных микозов. К числу таких возбудителей относят дрожжевые грибы рода *Malassezia* из семейства *Malasseziaceae*, ранее известные как *Pityrosporum*. Грибы рода *Malassezia* могут расти в микроаэрофильных и анаэробных условиях, формировать биопленки на поверхностях различных материалов, что особенно актуально в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии, поскольку пребывание в стационарах данного профиля сопряжено с проведением пациентам большого количества инвазивных процедур, использованием сосудистых катетеров и искусственных имплантов. Различные виды *Malassezia* входят в состав нормальной микрофлоры человека и некоторых теплокровных животных, но при определённых условиях они могут являться и причиной грибковых заболеваний. В мировой литературе описаны случаи фунгемии, вызванной *Malassezia furfur* (*M. furfur*), у пациентов с иммунодефицитом: взрослых и детей. Основным фактором риска фунгемии, ассоциированной с *M. furfur* у пациентов со сниженным иммунитетом, является проведение парентерального питания липидными растворами. Это

связано с особенностями метаболизма гриба, для поддержания жизнедеятельности которого необходимы липиды.

Работа Родченко Ю.В. «Грибы *Malassezia furfur* у новорожденных отделений хирургии, реанимации и интенсивной терапии: оптимизация микробиологической диагностики» является практически и научно значимой. Роль *M. furfur* в возникновении диссеминированной грибковой инфекции у пациентов с иммуносупрессией, таких как онкологические больные, пациенты хирургического профиля, новорождённые с ОНМТ и ЭНМТ при рождении, остаётся во многом недооцененной из-за дефектов в микробиологической диагностике этих инфекций. В рамках данной научной работы доказана роль *M. furfur* в развитии инфекционного процесса.

*M. furfur* практически не культивируется на селективных для дрожжевых грибов плотных питательных средах. Эти грибы не размножаются в питательных средах для гемокультивирования и соответственно не могут быть выделены и идентифицированы из крови. В связи с чем актуальным представляется усовершенствование микробиологической диагностики грибковых инфекций, вызванных *M. furfur* и проведение динамического мониторинга за колонизацией новорождённых, находящихся на лечении в отделениях хирургии, реанимации и интенсивной терапии (ОХРИТ) и ОРИТ с целью получения объективной картины роли *M. furfur* в патологии новорождённых при современных возможностях лечения и профилактики. В рамках данной работы разработана селективная питательная среда для выделения *M. furfur*, а также разработан и внедрен в практическое здравоохранение алгоритм микробиологической диагностике *M. furfur*.

## **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Научные положения и выводы диссертации основаны на результатах ретроспективного анализа микробиологических исследований, проведенного с 2015-2018 гг. на базе лаборатории микробиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

В исследование были включены все новорождённые – пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых (ОРИТН) и отделения хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорождённых (ОХРИТН), находившиеся на лечении в центре более 7 дней. Контингент пациентов ОРИТН представлен преимущественно недоношеными и глубоко недоношеными новорождёнными с ОНМТ и ЭНМТ при рождении, а ОХРИТН – новорождёнными с врождёнными пороками развития, которым проводилось хирургическое лечение, в том числе 30% из них – с пороками развития органов брюшной полости.

В период с 2015 по 2018 год проведено микробиологическое обследование 4008 новорождённых: 65% (n=2604) из ОРИТН и 35% (n=1404) из ОХРИТН. Проанализированы результаты посевов 24662 проб клинического материала, из них 19532 – со слизистых оболочек ЖКТ и 5130 из клинически значимых локусов. Проанализированы 555 проб аутопсийного материала от 147 умерших пациентов отделения ОРИТН (n=61) и ОХРИТН (n=86). Однократно, с эпидемиологической целью, исследован биологический материал (соскобы с кожи заушных складок) на *M. furfur* 65 сотрудников вышеперечисленных отделений, из них 22 сотрудника отделения ОХРИТН и 43 - ОРИТН.

В результате микробиологического мониторинга в ОРИТН и ОХРИТН отмечена высокая высеиваемость *M. furfur* - 76% от всех выделенных грибов (1365/1808): *M. furfur* выявлена у 9,7% обследованных новорождённых (387/4008), что говорит о клинической значимости данного микроорганизма.

Диссеминация процесса подтверждена у 25-38,5% новорождённых с положительными результатами исследования, при этом чаще всего она наблюдалась на фоне колонизации ЖКТ.

Доказано, что очень низкая и экстремально низкая масса тела при рождении и оперативные вмешательства являются важными факторами риска по развитию системных микозов вызванных *M. furfur* у новорождённых.

Показана необходимость усовершенствования метода *MALDI-TOF-MS* анализа и биохимических методов для видовой идентификации дрожжевых грибов вида *M. furfur*. С целью быстрой диагностики грибковых инфекций у новорождённых целесообразно использование комплексной диагностической тест-системы, основанной на методе количественной ПЦР для идентификации дрожжевых грибов, в состав которой входит видоспецифический праймер для детекции *M. furfur*.

Экспериментально, на средах разработанных с учётом питательных особенностей гриба, с использованием метода серийных разведений в микропланшетах и Е-тестов, показана высокая резистентность клинических изолятов *M. furfur* к флуконазолу (более 256 мкг/мл), каспофунгину (более 32 мкг/мл), микафунгину (более 32 мкг/мл) и чувствительность к амфотерицину В (0,25-0,75 мкг/мл).

Разработанная селективная питательная среда в 97% случаев позволяет культивировать дрожжевые грибы вида *M. furfur* из любого клинического материала.

Созданная коллекция изолятов *M. furfur* и задепонированный контрольный штамм *Malassezia furfur* Y147 могут быть использованы для контроля качества питательных сред, проведения рутинных и научных микробиологических исследований.

Дополнение к стандартному набору питательных сред селективной среды для выделения *M. furfur* и внедрение ПЦР метода с использованием тест-системы

«МикозоСкрин» позволили повысить эффективность микробиологической диагностики новорождённых с подозрением на развитие грибковой инфекции.

### **Новизна научных данных**

1. Впервые показана значимость *M. furfur* в течении инфекционного процесса у новорождённых отделений реанимации и интенсивной терапии: дрожжевые грибы *M. furfur* могут вызывать диссеминированную грибковую инфекцию у детей с ОНМТ и ЭНМТ при рождении и у новорождённых с врождёнными пороками развития после хирургических вмешательств.
2. Впервые проведена комплексная сравнительная оценка микробиологических методов диагностики *M. furfur* (культуральный метод с идентификацией по биохимическим показателям и *MALDI-TOF-MS*; количественная ПЦР и секвенирование видоспецифического участка гена 26S рРНК): определена роль методов в диагностике грибковых инфекций у новорождённых, вызванных *M.furfur*, показаны преимущества и недостатки каждого из них.
3. Впервые экспериментальным путём изучена чувствительность клинических изолятов *M. furfur* к антимикотическим препаратам и показана устойчивость к флюконазолу (более 256 мкг/мл) и чувствительность к амфотерицину В (менее 2 мкг/мл).
4. Разработана селективная питательная среда для выделения *M. furfur* из клинического материала на основе модифицированного агара по прописи Диксона с добавлением флюконазола в качестве селективной добавки с целью подавления роста других дрожжевых грибов (Заявка на патент № 2020116304 от 29 апреля 2020 года).
5. Впервые 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).

6. Впервые создана и охарактеризована коллекция штаммов *M. furfur*, выделенных из клинического материала новорождённых и медицинского персонала. Штамм *Malassezia furfur* Y147 задепонирован 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).

### **Значение полученных результатов**

Проведённое исследование показало целесообразность внедрения в практику клинической микробиологии разработанной селективной питательной среды для выделения и определения чувствительности грибов *M.furfur* к антимикотическим препаратам с использованием Е-тестов: состав питательной среды может быть предложен в дальнейшем к промышленному производству.

Показана недостаточная эффективность метода *MALDI-TOF-MS* анализа в рутинной практике микробиологических лабораторий для видовой идентификации дрожжевых грибов вида *M. furfur* на современном этапе.

Показана целесообразность использования разработанной и апробированной комплексной диагностической тест-панели, основанной на методе количественной ПЦР для идентификации дрожжевых грибов, в состав которой входят родоспецифический праймер для детекции грибов рода *Malassezia* и видоспецифический для детекции *M. furfur* с целью быстрой диагностики грибковых инфекций у новорождённых.

Собранныя и охарактеризованная коллекция дрожжевых грибов *M. furfur* может быть применена в дальнейших научных исследованиях, а впервые задепонированный штамм *M. furfur* Y147 использоваться как контрольный штамм при производстве питательных сред и контроле качества микробиологических исследований.

Материалы исследования и рекомендации нашли отражение в разработанном и внедрённом в практику стационара алгоритме

микробиологического мониторинга, диагностики и профилактики инфекций, вызванных дрожжевыми грибами *M. furfur*, у новорождённых находящихся на выхаживании в отделениях хирургии, реанимации и интенсивной терапии (утверждён директором института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии и заместителем директора по науке ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России).

### **Заключение**

Диссертационная работа Родченко Юлии Валерьевны на соискание ученой степени кандидата медицинских наук актуальна, имеет большое значение для практического здравоохранения, выполнена в соответствии с требованиями ВАК, предъявляемыми к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Диссертационная работа, выполненная под научным руководством д.м.н. Припутневич Т.В. и профессора, д.м.н. Зубкова В.В. может быть представлена к официальной защите.

Заключение обсуждено на аprobационной комиссии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России (07.09.2020 протокол № 27).

Председатель:

академик РАН, д.м.н., профессор

Серов В.Н.

Секретарь:

д.м.н., профессор

Баранов И.И.