



**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)**

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18
12.05.2023 № _____

Тел: 8 499-193-30-01
Факс: 8 499-193-61-83

<http://www.gamaleya.org>
E-mail: info@gamaleya.org

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, Чернуха Марины Юрьевны на диссертационную работу Козлова Андрея Владимировича на тему «Клинико-лабораторная оценка инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. - клиническая лабораторная диагностика, 1.5.11. - микробиология.

Актуальность темы исследования

Клинико-лабораторная диагностика хронической инфекции легких у пациентов с муковисцидозом является актуальной проблемой современной медицины. Продолжительность и качество жизни таких пациентов, а также прогноз течения заболевания зависит от своевременной и точной диагностики этиологии бронхолегочных инфекционных осложнений, эффективности антибиотикотерапии, приводящей к эрадикации мультирезистентных возбудителей инфекции. Микробиота бронхолегочной системы, выявляемая при работе с клиническим материалом больных муковисцидозом, характеризуется определенными особенностями и видовым разнообразием микроорганизмов, в том числе неферментирующих грамотрицательных бактерий, и отличается по составу от микробиоты дыхательных путей, с которой врач-бактериолог встречается в рутинной

практике. Редко встречающиеся микроорганизмы, в первую очередь неферментирующие грамотрицательные бактерии, становятся причиной хронического инфекционно-воспалительного процесса в нижних дыхательных путях пациентов с муковисцидозом, который характеризуется периодическими обострениями, сопровождающимися резким ухудшением состояния, что может приводить к бактериемии, септицемии и летальному исходу в краткосрочный период. В связи с этим становится необходимой оптимизация микробиологических методов диагностики, позволяющая сократить сроки культивирования и сохранить качество видовой идентификации основных патогенов, вызывающих инфекционные осложнения у пациентов с муковисцидозом.

Согласно Клиническим рекомендациям «Кистозный фиброз (муковисцидоз)» (2021г.), бактериологические посевы должны проводиться регулярно в течение года и обязательно при ухудшении состояния пациента. При этом необходимо отметить, что микробиологическое исследование для выявления клинически значимых неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, бактерий *Burkholderia cepacia complex*) подразумевает культивирование посевов в течение 5 суток, что является слишком длительным временным промежутком при обострении инфекционного процесса или развитии «цепация-синдрома» у пациента. Поэтому актуальным представляется поиск и валидация лабораторных маркеров, доступных для применения в короткий срок и дающих возможность прогнозировать развитие и течение обострения хронического инфекционного процесса в легких пациента с муковисцидозом.

Таким образом, актуальность темы диссертационной работы Козлова Андрея Владимировича обоснована, в ней четко определена цель, направленная на поиск дополнительных клинико-лабораторных критериев диагностики инфекционно-воспалительных процессов в легких у пациентов с

муковисцидозом для прогнозирования риска развития осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями.

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

Научная новизна диссертационного исследования заключается в том, что Козловым А.В. впервые исследовано содержание показателей обмена железа в мокроте у пациентов с муковисцидозом. Автором отмечена корреляционная зависимость высоких значений свободного железа и ферритина в мокроте с инфицированием легких больных муковисцидозом неферментирующими грамотрицательными бактериями. Предложены критерии коэффициента персональной критической разницы для содержания ферритина в мокроте у пациентов с муковисцидозом и высевом *Burkholderia cepacia complex* для оценки риска развития осложнений и степени участия микроорганизма в инфекционном процессе.

Впервые проведены и представлены результаты стандартизации пробоподготовки образцов мокроты и валидация биохимических методик для ее анализа. Показана приемлемость использования биохимического исследования для определения ферритина, трансферрина и свободного железа в мокроте.

Диссертантом впервые проведено исследование, направленное на установление влияния органической соли железа на продуктивность питательных сред, для выделения бактерий *Burkholderia cepacia complex* из клинического материала от пациентов с муковисцидозом. Также проведено сравнение результатов идентификации с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии представителей бактерий *Burkholderia cepacia complex*, выделенных от пациентов с муковисцидозом, выращенных на питательных средах с железосодержащей добавкой и без нее.

Автором проанализирован видовой состав микробиоты, выделенной из нижних дыхательных путей пациентов Самарской области за 2017-2019 годы. Показано значительное преобладание клинически значимых микроорганизмов в группе неферментирующих грамотрицательных бактерий.

Поставленные диссертантом цель и задачи исследования успешно выполнены. Основные научные положения, выводы и практические рекомендации сформулированы исходя из результатов достаточного объема исследований статистически достоверного количества образцов. Выводы диссертационного исследования корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данные, полученные диссертантом, имеют существенное как теоретическое, так и практическое значение.

Автором научно обосновано значение железа для метаболизма неферментирующих грамотрицательных бактерий и механизмы его получения из окружающей среды. Подтверждены возможности биохимического исследования мокроты с поэтапным описанием проведения валидирующих мероприятий для последующего определения содержания свободного железа, ферритина и трансферрина. Диссертантом показано, что инфицирование респираторного тракта больных муковисцидозом неферментирующими грамотрицательными бактериями сопровождается значительным повышением количества железа и ферритина в мокроте, а также отмечена тенденция по снижению данных показателей в сыворотке крови.

Проведенный анализ структуры микробиоты пациентов с муковисцидозом в Самарской области выявил значительное количество возбудителей из *Burkholderia cepacia complex*, медиана срока выделения которых составила четверо суток. При этом применение предлагаемой

автором железосодержащей добавки достоверно повышает показатель продуктивности плотных питательных сред и сокращает срок проводимого исследования до двух суток.

Полученные результаты исследования внедрены в учебную работу кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой и общей и клинической микробиологии, иммунологии, аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Практические рекомендации, полученные по результатам диссертационной работы используются в исследованиях отдела лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, клинико-диагностических лабораторий Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ГБУЗ «Самарская областная детская клиническая больница им. Н.Н. Ивановой», ГБУЗ СО «Тольяттинская городская больница №5».

Достоверность и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием комплекса современных, воспроизводимых бактериологических, биохимических методов, MALDI-ToF масс-спектрометрии. Для обоснования основных положений были использованы анализ литературы, изучение нормативных документов, лабораторные и статистические методы.

Экспериментальная часть диссертационной работы Козлова Андрея Владимировича проведена с соблюдением этических норм научных исследований.

По теме диссертации опубликованы 5 статей в журналах, рекомендуемых ВАК, результаты работы представлены на 9 всероссийских и международных конференциях. На предложенные автором способы оценки риска осложнений и активности инфекционного процесса в легких больных муковисцидозом, а также разработанную питательную среду получены патенты РФ (Патент РФ № 2686052, Патент РФ № 2759831).

Оценка содержания, завершённости и оформление диссертации

Диссертация Козлова Андрея Владимировича является завершённой работой, построенной по традиционному плану, изложенной литературным языком на 160 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 таблицами и 29 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 4 глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, который включает 26 отечественных и 132 зарубежных источников.

После введения, в котором отражены данные об актуальности темы, определены цель и задачи исследования, представлен обзор литературы по освещаемой проблеме, в котором автор анализирует данные литературы для формирования собственной оценки проблемы клинико-лабораторной диагностики инфекционных осложнений у пациентов с муковисцидозом. Обзор литературы аргументирует необходимость проведения диссертационной работы и связан с материалом, представленном в главах собственных исследований. В обзоре приведены современные данные, касающиеся этиопатогенетических и эпидемиологических особенностей муковисцидоза, трудностей лабораторной диагностики при муковисцидозе, роли железа в метаболизме неферментирующих грамотрицательных бактерий, механизмов получения и захвата железа из окружающей среды у

неферментирующих грамотрицательных бактерий и их роли в патогенезе инфекционного процесса в легких у пациентов с муковисцидозом.

В главе 2, посвященной описанию материалов и методов исследования, представлены данные об использовании современных микробиологических и лабораторных методов исследования, позволяющих получить достоверные результаты на достаточном количестве исследуемых образцов. Представлена схема дизайна исследования. Использование пакета современных компьютерных программ математической и статистической обработки позволяет автору делать обоснованные выводы и давать практические рекомендации.

В главах, в которых представлены результаты собственных исследований, последовательно решаются поставленные задачи, соответствующие цели работы.

Третья глава посвящена анализу структуры микробиоты, выделенной из мокроты пациентов с муковисцидозом в Самарской области с 2017 по 2019 годы. Автором проведено ранжирование микроорганизмов по клиническому значению в соответствии с руководством по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом. Показано клиническое значение грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов. Бактерии *Burkholderia cepacia complex* были выделены у 33 пациентов (37,5% от общего числа обследованных), что является эпидемиологически значимым показателем для региона Самарской области.

В четвертой главе оценивается возможность биохимического анализа мокроты, в связи с чем автором подробно описаны этапы проведения валидации методик по исследованию свободного железа, ферритина и трансферрина. Была обоснована необходимость рассчитать коэффициент критической разницы (RCV% – reference critical value) для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении. Проведенные

валидирующие мероприятия позволяют использовать метод биохимического исследования мокроты для определения железа и железосодержащих белков, для дополнительной оценки тяжести течения инфекционно-воспалительного процесса, вызванного неферментирующими грамотрицательными микроорганизмами в легких у пациентов с МВ.

В пятой главе приводятся результаты биохимического исследования мокроты и сыворотки крови пациентов с муковисцидозом, бронхитом и пневмонией. Был сделан вывод о повышенных значениях свободного железа и ферритина в мокроте больных муковисцидозом. В сыворотке крови напротив, отмечено снижение показателей обмена железа по сравнению с пациентами с другими заболеваниями. Последующее отдельно проведенное исследование в группе больных муковисцидозом выявило более высокие показатели железа и ферритина в мокроте пациентов, у которых по результатам микробиологического исследования в мокроте были выявлены неферментирующие грамотрицательные бактерии, по сравнению с пациентами, инфицированными другими микроорганизмами. Использование биохимического метода исследования мокроты у пациентов с МВ с последующим расчетом показателя PCV% может применяться для оценки тяжести течения инфекционно-воспалительного процесса в легких и прогнозирования риска обострения хронического инфекционного процесса, в частности развития «цепация-синдрома» ($PCV\% > RCV\%$ – изменение клинически значимо; $PCV\% < RCV\%$ – изменение клинически не значимо).

Шестая глава диссертации посвящена оценке возможности использования железосодержащей добавки в селективной питательной среде, применяемой для выделения бактерий из *Burkholderia cepacia complex*. Автором проведена оценка влияния органической соли железа на показатели продуктивности и селективности питательных сред. Концентрации железа 80 мг/л достоверно повышают показатель продуктивности питательной среды по сравнению с применяемыми на практике коммерческими селективными

средами, при этом не нарушая критериев селективности, что позволяет сократить сроки культивирования возбудителей *Burkholderia cepacia complex*, сохраняя их культуральные свойства. Также проанализировано влияние добавки на видовую идентификацию культур, выращенных на предлагаемой питательной среде с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии. Использование ростовой добавки позволяет повысить качество идентификации.

В главе «Заключение» автор анализирует и обсуждает полученные данные с точки зрения современных тенденций, формулирует собственное мнение о дальнейших перспективах разработки темы, основанное на полученных данных. Выводы логичны и вытекают из результатов исследования, соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации сформулированы четко, имеют значение для здравоохранения в целом и лабораторной службы в частности.

Автореферат диссертационной работы Козлова А.В. полноценно отражает содержание диссертационной работы.

Соответствие специальности

Диссертационная работа, выполненная Козловым А.В., по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам соответствует паспорту специальности 3.3.8. - клиническая лабораторная диагностика, а также паспорту специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки) со следующими областями исследований: пункты 2 «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и 4 «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

Замечания по диссертационной работе

В целом работа Козлова Андрея Владимировича оставляет хорошее впечатление. Содержание диссертации, ее оформление, характер изложения материала соответствуют всем установленным критериям.

Существенных замечаний по работе и тексту диссертации нет. Оценивая представленную работу, безусловно, положительно, хотелось бы уточнить у автора вопрос, которые возник при ее анализе:

1. Учитывая эпидемиологическое и клиническое значение исследованных вами микроорганизмов *Burkholderia cenocepacia* complex, к каким генотипам (MLST) принадлежали выделенные во время исследования штаммы?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Козлова Андрея Владимировича на тему: «Клинико-лабораторная оценка инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, 1.5.11. Микробиология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований решена актуальная задача поиска дополнительных лабораторных показателей, позволяющих оценить и спрогнозировать течение инфекционно-воспалительного процесса нижних дыхательных путей, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями, что имеет существенное значение для клинико-лабораторной диагностики, микробиологии и терапии инфекционных осложнений у больных муковисцидозом.

Представленная диссертационная работа соответствует требованиям, установленным пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018 № 1168 с изменениями от 26.05.2020), а ее автор, Козлов Андрей Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент

Руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России)

Адрес: 123098, г.Москва, ул.Гамалеи, дом 18
тел.: 8 (499) 193-30-01

e-mail: chernukha08@mail.ru, chernukha@gamaleya.org

доктор медицинских наук

Чернуха Марина Юрьевна

Подпись Чернуха Марины Юрьевны заверяю

Учёный секретарь
НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России
кандидат биологических наук

12.05.2023

Кожевникова Людмила Кондратьевна

