

## ОТЗЫВ официального оппонента

доктора медицинских наук профессора начальника центра клинической лабораторной диагностики – главного лаборанта федерального государственного бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н.Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации Казакова Сергея Петровича на диссертационную работу Козлова Андрея Владимировича «Клинико-лабораторная оценка инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом», представленную в диссертационный совет 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М.Никифорова» МЧС РФ к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.11. Микробиология

### **Актуальность темы исследования**

Муковисцидоз (МВ) является одним из самых распространенных аутосомно-рецессивных наследственных заболеваний. Распространенность данной патологии широко варьируется и зависит от географических зон и этнической принадлежности, но наиболее часто заболевание встречается у представителей европеоидной расы. Диагностика МВ в настоящее время осуществляется на уровне пренатального скрининга новорожденных с использованием стандартных тестов. Окончательное подтверждение должно производиться путем молекулярно-генетических исследований на выявление мутаций гена CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), что приводит к дисфункции одноименного белка – трансмембранного регулятора МВ (МВТР).

МВТР (CFTR) является цАМФ-зависимым хлорным каналом, который обеспечивает активный транспорт ионов хлора, а также опосредованно регулирует абсорбцию ионов натрия. Разработка новых подходов к диагностике и терапии инфекционных осложнений больных МВ требует глубокого анализа и понимания методов микробиологической и лабораторной диагностики в целях формирования спектра возбудителей,

методов биохимического анализа мокроты и сыворотки крови у этих пациентов.

Появление новых лабораторных методов требует их стандартизации и валидации согласно нормативно-правовым документам, регламентирующим работу в области клинической лабораторной диагностики. Несомненно, введение данных методов требует разработки стандартных подходов к преаналитическому этапу сбора биоматериала, в частности, мокроты для последующего биохимического исследования железа, ферритина и трансферрина.

Данное диссертационное исследование посвящено всесторонней разработке дополнительных клинико-лабораторных критериев диагностики инфекционно-воспалительных процессов в лёгких у пациентов с МВ для прогнозирования риска развития осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями, внедрению их в практику врачей-педиатров, пульмонологов, микробиологов, специалистов клинической лабораторной диагностики и других смежных специальностей.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достаточный объем, использование современных микробиологических и лабораторных биохимических методов и оборудования, а также адекватная статистическая обработка результатов убеждают в обоснованности научных положений и выводов. Используемые при планировании диссертационного исследования принятые микробиологические алгоритмы и методы базируются на известных и проверяемых фактах. Основные положения и выводы диссертации в полном объеме определены результатами исследования и соответствуют содержанию работы, ее цели и задачам.

По теме диссертационного исследования опубликовано 17 печатных работ, из них 5 – в журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для

опубликования основных научных результатов диссертаций, получено 3 патента на изобретение.

Результаты исследования и основные положения диссертационной работы были неоднократно представлены и обсуждены на девяти научных конференциях всероссийского и международного уровня. Публикации полностью отражают основные результаты исследования.

**Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Количество пациентов(88) и спектр методов микробиологической и биохимической диагностики соответствуют заявленному уровню и специальности диссертации. Достоверность результатов и обоснованность выводов базируются на адекватности дизайна исследования, достаточном объеме исследований, корректной значительной статистической обработке результатов с использованием различных методов статистики.

Представленная работа обладает несомненной научной новизной – предложен новый стандарт проведения преаналитического этапа для лабораторного исследования мокроты.

Проведен комплекс валидирующих мероприятий для биохимического исследования содержания железа, ферритина и трансферрина в мокроте.

Построены расчеты коэффициентов критической разницы показателей железа и ферритина в мокроте, которые были использованы для динамического наблюдения за развитием инфекционного процесса в лёгких, вызванного неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с МВ.

Автором предложены критерии коэффициента персональной критической разницы для количественной оценки содержания ферритина в мокроте у пациентов с МВ и бактериологическим высеvom *Burkholderia cepacia* complex для оценки риска развития осложнений и степени участия этого микроорганизма в инфекционном процессе.

Представлены результаты разработки питательной среды для культивирования микроорганизмов из группы *Burkholderia cepacia* complex с железосодержащей добавкой, позволяющей повысить показатели продуктивности и высеваемости данного микроорганизма.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Представленная диссертационная работа обладает несомненной теоретической и практической значимостью для специальности «Микробиология и клиническая лабораторная диагностика». Результаты данной работы существенно расширяют методологию теоретического обоснования использования новых лабораторных биохимических методов исследования обмена железа, уровней белков, участвующих в балансе и транспортировке железа – ферритина и трансферрина в мокроте у больных МВ. Автором предложен стандартизированный этап преаналитической пробоподготовки мокроты для последующего биохимического анализа по исследованию обмена железа.

По результатам серии лабораторных испытаний биохимических методов определения железа, ферритина, трансферрина в мокроте проведены валидирующие мероприятия: определение внутрииндивидуальной биологической вариации, расчет общей аналитической ошибки, определение линейности и рабочего диапазона разрабатываемых методик, аналитической специфичности, внутрисерийной невоспроизводимости методов исследования показателей обмена железа в мокроте, определения коэффициента критической разницы (RCV%), показателей обмена железа в мокроте для оценки значимости изменений этих показателей при динамическом наблюдении и расчет коэффициента персональной разницы, индивидуально для каждого пациента.

Особенно ценным явилось использование автором ROC-анализа, на основании которого установлены пороговые значения PCV для ферритина с

расчетом уровней чувствительности и специфичности в рамках оценки риска осложнения инфекционного процесса у пациентов с МВ. Также автором были применены методы сигмометрии, что не часто можно встретить при анализе результатов исследования, разработан алгоритм обследования пациентов с МВ с использованием микробиологических и биохимических методов исследования в состоянии обострения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте, которые по неизвестной причине не нашли отражения в практических рекомендациях. Вдобавок автором проведен анализ разнообразия неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных из нижних дыхательных путей пациентов с МВ в Самарской области.

В исследовании проведена разработка плотной питательной среды для культивирования микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex и практически представлены результаты выявления этого микроорганизма на этой среде. Одновременно с этим были представлены результаты использования этой среды для повышения показателя продуктивности плотных питательных сред, сокращения сроков культивирования и улучшения результатов идентификации *Burkholderia cepacia* complex с использованием метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

#### **Оценка содержания, законченности и оформления диссертации**

Диссертация изложена на 160 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений. Список литературы включает 158 источников, из них 26 отечественных и 132 зарубежных источников. В то же время за последние пять лет в списке литературы автор ссылается на более чем 34,18% литературных источников (показатель, рекомендованный ВАК – 25%). Текст диссертации содержит 29 рисунков и 20 таблиц.

Введение содержит актуальность темы и степень ее разработанности, цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов исследования, личный вклад автора, соответствие диссертации паспорту научной специальности, внедрение результатов в практику, публикации, объём и структуру диссертации.

В главе I представлен достаточно обширный обзор литературы, в котором изложены исчерпывающие сведения об этиопатогенетических и эпидемиологических особенностях МВ, методы микробиологической и лабораторной диагностики при МВ, проблемы при микробиологической диагностики больных с МВ, метаболитах и патогенезе инфекционно-воспалительного процесса в лёгких пациентов при МВ, уровень железа и железосвязывающих белков как возможных маркеров инфекционных осложнений у пациентов с МВ, возможности биохимического исследования мокроты в клинко-диагностической лаборатории, роли железа в метаболизме неферментирующих грамотрицательных бактерий, механизмы получения и захвата железа из окружающей среды у неферментирующих грамотрицательных бактерий и их роли в патогенезе инфекционного процесса в лёгких у пациентов с МВ и использование железа для выделения и культивирования неферментирующих грамотрицательных бактерий из материала от пациентов с МВ.

Материал, представленный в обзоре литературы, свидетельствует о том, что автором достаточно глубоко изучено современное состояние, патогенез, микробиологические и лабораторные методы, используемые по изучаемой теме.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит сведения о дизайне работы, используемых микробиологических и лабораторных биохимических методах и оборудовании, наборах реагентов сравнения,

контрольных материалах, образцах биологического материала, их подготовки и хранения.

Заключительный раздел главы II содержит информацию об использованных автором различных методов статистической обработки полученных данных.

В главе III представлены результаты собственных исследований по изучению видового разнообразия микроорганизмов, выделенных из нижних дыхательных путей у пациентов с МВ, в том числе неферментирующих грамотрицательных бактерий. Изучены и представлены данные по распространенности бактерий, имеющих доказанное клиническое значение в развитии лёгочной патологии при МВ.

В главе IV проведены валидирующие мероприятия для лабораторного биохимического исследования показателей обмена железа в мокроте. Данные мероприятия включали в себя определение внутрииндивидуальной биологической вариации, расчет общей аналитической ошибки, определение линейности и рабочего диапазона разрабатываемых методик, аналитической специфичности, внутрисерийной невоспроизводимости методов исследования показателей обмена железа в мокроте, определения коэффициента критической разницы и расчета коэффициент персональной разницы. Использовалась методика сигмометрии для оценки аналитической эффективности методик определения обмена железа в мокроте. Выявлен превосходный уровень приемлемости S5-S6 для железа и ферритина и хороший уровень приемлемости для трансферрина – S4-S5.

В главе V описаны маркеры воспаления с использованием микробиологических и биохимических методов исследования у пациентов с пневмониями, бронхитами и МВ. По результатам микробиологических методов исследования в исследуемых группах определены наиболее значимые патогены, а также проведена сравнительная характеристика уровней показателей обмена железа (железо, ферритин и трансферрин),

выступающих маркерами воспаления в этих группах. Показаны значимые различия по некоторым показателям обмена железа (железо, ферритин) по данным статистической обработки непараметрическими методами, корреляции по Спирмену, ROC-анализа в группах больных с МВ по сравнению с группами больных пневмониями и бронхитами. Представлены клинические примеры, показывающие использование коэффициента персональной разницы и ROC-анализа для оценки определения риска обострения инфекционного процесса, оптимальные пороговые значения данного показателя и приемлемые уровни чувствительности и специфичности для выбранных пороговых значений.

В VI главе приводятся результаты разработки селективной питательной среды для оптимизации культивирования микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex, результаты оценки показателей продуктивности селективной питательной среды с железосодержащей ростовой добавкой (железа III гидроксид полимальтозат) и ее влияние на селективность питательной среды, определения оптимальной концентрации железа (80 мг/л) в среде. Представлены данные о возможности повышения качества идентификации представителей *Burkholderia cepacia* complex методом MALDI-ToF масс-спектрометрии на разработанной среде с содержанием железосодержащей ростовой добавки (железа III гидроксид полимальтозат).

В заключении представлены результаты собственных исследований ROC-анализа по установлению пороговых значений PCV для ферритина и приемлемые уровни чувствительности и специфичности в рамках оценки риска осложнения инфекционного процесса у пациентов с МВ, а также приводится алгоритм обследования пациентов с МВ в состоянии обострения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте.

Выводы в основном сформулированы, логично вытекают из содержания работы и дают ответы на вопросы, поставленные в цели и



задачах исследования. Практические рекомендации обоснованы и несут важную информацию.

Результаты исследования проиллюстрированы достаточным количеством рисунков, таблиц и схем, соответствующих содержанию глав.

В целом диссертация оформлена согласно действующим требованиям и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную на достаточном и адекватном методологическом уровне с использованием современных методов.

### **Замечания**

Проведена значительная работа с использованием микробиологических и лабораторных биохимических методов исследований, выполненная на стыке двух специальностей и носящая, несомненно, междисциплинарный характер. Принципиальных замечаний, влияющих на общую положительную оценку диссертационного исследования, не имею.

Вместе с тем при знакомстве с работой, возникло несколько предложений:

1) в заключении приводятся расширенно данные, которые четко отражают дополнительные результаты собственных исследований, основанных на ROC-анализе. В главах собственных исследований (стр.100) также приводятся эти данные, занимающие один абзац текста, но их подробное описание рассматривается почему-то в заключении;

2) в заключении приводится алгоритм обследования пациентов с МВ в состоянии обострения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте.

На мой взгляд, эти абсолютно правильные и интересные данные должны быть размещены в главах результатах собственных исследований, а не в заключении, так как заключение предполагает постановку проблемы по данным литературного обзора, целей и задач исследования и ответа на нее с учетом полученных результатов собственных исследований.

Также в практических рекомендациях одним из пунктов можно было бы добавить разработанный алгоритм обследования пациентов с МВ в состоянии обострения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте, что является, несомненно, практической рекомендацией для специалистов, занимающихся диагностикой и лечением МВ.

В разделе «Структура и объем диссертации» автор забыл указать список сокращений.

Дополнительно хочется отметить хороший стиль изложения рукописи и наличие в ней единичных грамматических и стилистических ошибок (стр.27).

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат выполнен в соответствии с предъявляемыми требованиями ГОСТ, представляет собой краткое содержание диссертации с достаточно необходимой информацией. Замечаний по оформлению автореферата нет, за исключением однотипных недостатков, указанных выше при анализе самой диссертационной работы.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Козлова В.А. «Клинико-лабораторная оценка инфекционных осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.11. Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена **актуальная научная задача** по определению дополнительных клинико-лабораторных критериев диагностики инфекционно-воспалительных процессов в лёгких у пациентов с муковисцидозом для прогнозирования риска развития осложнений,

вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями, что имеет существенное значение для развития клинической лабораторной диагностики и микробиологии.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, (ред. от 01.10.2018 г., № 1168 с изменениями от 26.05.2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика и 1.5.11. Микробиология.

**Официальный оппонент:**

Начальник центра клинической лабораторной диагностики  
– главный лаборант ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь  
имени академика Н.Н.Бурденко»  
Министерства обороны Российской Федерации  
доктор медицинских наук профессор

«05» мая 2023 г.

Казаков С.П.

105094, России, г. Москва, Госпитальная пл., д. 3.  
раб.тел. 8 (499) 263-01-73; моб.тел.8 (916) 383-62-82;  
e-mail: [gvkg.ckld@mail.ru](mailto:gvkg.ckld@mail.ru).

Подпись д.м.н. Казакова С.П. заверяю:



В.А. Терещенко