



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного  
Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»  
**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора**  
664047 Иркутск, Трилиссера, 78  
Тел. 22-01-35, факс 22-01-40  
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru  
<http://www.irkutsk.ru/chumin>

ОКПО 01898090, ОГРН 10223801543017  
ИНН/КПП 3811015807/381101001

12.05.2016 № 357

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ г.

[ ]

## ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы  
Маркина Александра Михайловича «Совершенствование идентификации  
возбудителей особо опасных микозов на основе молекулярно-генетических  
методов», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских  
наук по специальности 03.02.03 – микробиология

**Актуальность избранной темы исследования.** Роль вызываемых грибковыми  
микроорганизмами инфекционных болезней в патологии человека весьма значитель-  
на. Несмотря на то, что многие глубокие (системные) микозы принято считать «эк-  
зотическими», «тропическими», в настоящее время в связи с развитием туризма,  
увеличением миграции населения, расширением контактов с другими странами, уг-  
розой биотerrorизма возрастает возможность их завоза в Россию из эндемичных

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ Иркутский научно-  
исследовательский противочумный  
институт Роспотребнадзора, профессор



С.В. Балахонов

12 мая 2016г.

стран. Необходимо отметить, что выявляемость глубоких микозов является непростой задачей. Нередко диагностика глубоких микозов бывает запоздалой, что может приводить к серьезным осложнениям и, в ряде случаев, даже летальному исходу инфицированных. В связи с этим, своевременное распознавание глубоких (системных) микозов человека следует отнести к актуальным проблемам современной медицины и микробиологии. Стандартные методы идентификации возбудителей глубоких микозов – прямое микроскопическое исследование, выделение чистой культуры, гистология, иммунный анализ – обладают ограниченными чувствительностью и специфичностью, длительны по времени проведения анализа. Напротив, молекулярно-генетические методы идентификации патогенных микроорганизмов отличаются существенными преимуществами в скорости, чувствительности и специфичности, что делает их незаменимыми для решения различных диагностических задач в микологии. Учитывая вышеизложенное, необходимо заключить, что тема диссертационной работы Александра Михайловича Маркина «Совершенствование идентификации возбудителей особо опасных микозов на основе молекулярно-генетических методов», цель которой заключалась в разработке системы идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на ПЦР в формате реального времени и секвенирования ДНК, несомненно актуальна и соответствует требованиям современной науки и практики.

**Новизна полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.** Новизна исследования и полученных автором результатов заключается в разработке оригинальных праймеров для обнаружения ДНК возбудителя бластомикозов на основе гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы. Впервые для повышения достоверности идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза предложено использовать сочетание реакции амплификации и последующего секвенирования фрагментов гена *MBP-1 Coccidioides immitis* и *C. posadasii*, участков гена *CBP-1 Histoplasma capsulatum*, фрагментов гена *BYS-1* и гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы *Blastomyces dermatitidis*. Новыми являются и данные о возможности идентификации возбудителей особо опасных микозов посредством секвенирования фрагментов гена

*28S pRNK* и гена рибосомального белка *L23*. Критериям новизны отвечает и предложение дополнить схему лабораторной диагностики особо опасных микозов этапом секвенирования.

**Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации.** Основная практическая значимость исследования заключается в разработке новых диагностических наборов, основанных на технологиях ПЦР и секвенирования ДНК, для совершенствования идентификации возбудителей особо опасных микозов, для определения которых недостаточно только морфологических и биохимических признаков.

Практическую ценность представляют материалы исследования, использованные при написании проектов двух методических рекомендаций («Лабораторная диагностика особо опасных микозов» и «Методические указания по порядку проведения лабораторной диагностики особо опасных микозов в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней»), подготовленных для утверждения в Роспотребнадзоре. Результаты компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей возбудителя бластомикоза, подбор праймеров и олигонуклеотидных зондов для выявления ДНК *B. dermatidis* представляют интерес для молекулярных биологов и микробиологов, занимающихся созданием диагностических наборов и тест-систем для ранней диагностики особо опасных микозов.

Предложенные автором диссертации тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени можно рекомендовать для выявления возбудителей особо опасных микозов в диагностических лабораториях медицинских учреждений, а также для мониторинга возбудителей глубоких микозов на базе Референс-центра.

Полученные в ходе выполнения диссертационного исследования материалы могут быть использованы в учебном процессе на курсах по программам дополнительного профессионального образования специалистов по дисциплинам «Микробиология», «Микология», «Биотехнология»

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.** Научные положения, выводы, заключение, сформулированные

автором, логичны, теоретически обоснованы и основаны на достаточном фактическом материале, полученном в экспериментальных исследованиях с использованием современных бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов, адекватных поставленным цели и задачам. Полученные материалы репрезентативны, статистически обработаны, тщательно проанализированы, что обеспечивает объективность выдвинутых положений и выводов. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, отражены в выводах, вытекающих из результатов проделанной работы и соответствуют поставленным целям и задачам.

**Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению.** Диссертационная работа А. М. Маркина выполнена во ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора в рамках плановых зарегистрированных научно-исследовательских работ: «Выявление возбудителей особо опасных микозов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов» и «Разработка тест-систем для молекулярно-генетической детекции возбудителей особо опасных микозов на основе ПЦР».

Рукопись диссертации А. М. Маркина оформлена традиционно. Её текст занимает 130 страниц машинописи и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списков сокращений и литературы. Список литературы представлен 27 отечественными и 168 (один источник под номером 66 упоминается дважды) зарубежными источниками. Диссертационная работа хорошо документирована рисунками, таблицами и графиками. Материал изложен ясно и логично.

В диссертации затрагивается широкий круг вопросов, касающихся современных методов идентификации возбудителей особо опасных микозов, вызываемых микроскопическими грибами родов *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides* II группы патогенности. Раздел «Введение» содержит основную информацию о проделанной работе. В нем автор теоретически обосновывает актуальность и целесообразность выполнения работы, формулирует цель и задачи исследования, харак-

теризует научную новизну и практическую ценность диссертации, приводит сведения об аprobации работы, опубликованных работах, структуре и объеме диссертации, перечисляет основные положения, выносимые на защиту. Однако следует отметить, что подраздел «Личный вклад автора» в автореферате не совсем полностью отражает реальное участие диссертанта. Знакомство с экспериментальной частью диссертации позволяет заключить, что основные результаты получены соискателем лично и при его непосредственном участии.

В главе «Обзор литературы», состоящей из четырех подразделов, достаточно детально изложено современное представление о таксономическом положении, биологии, факторах вирулентности, лабораторной диагностики и молекулярно-генетических методах идентификации возбудителей особо опасных микозов. Диссертант продемонстрировал свою эрудицию в изучаемой проблеме. Проведенный анализ литературы позволил отчетливо сформулировать актуальность, цель и задачи диссертационной работы.

Собственные исследования автора выполнены с использованием описанных в главе «Материалы и методы» современных микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических методов исследования и опытов на лабораторных животных. Всего в работе в качестве объектов исследования были использованы три штамма *B. dermatitidis*, шесть штаммов *C. immitis*, два штамма *C. posadasii*, восемь штаммов *H. capsulatum* var. *capsulatum*, три штамма *H. capsulatum* var. *Duboisii*, один штамм *H. capsulatum* var. *farciminosum* и 20 штаммов возбудителей оппортунистических микозов.

На первом этапе работы, результаты которого изложены в главе 3, проведено изучение культурально-морфологических особенностей возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза, сделано заключение о необходимости дополнительных методов идентификации для уточнения таксономического положения микромицетов.

Исследование ферментативной активности возбудителей особо опасных и медицински-значимых микромицетов с использованием колориметрической тест-

системы AUXACOLOR II показало, что данный подход не пригоден для их идентификации, но может найти применение для дифференциации штаммов возбудителей различных инвазивных микозов при постоянном наблюдении за возбудителями глубоких микозов.

В главе 4, посвященной конструированию амплификационной тест-системы с детекцией результатов в режиме реального времени для выявления ДНК возбудителя бластомикоза, автор обосновывает выбор участков гена *BYS-1* (*Blastomyces yeast-phase-specific 1*) и гена, кодирующего  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазу, в качестве ДНК-матрицы для индикации возбудителя бластомикоза с помощью ПЦР в режиме реального времени. Выбор данных генов основан на анализе и целенаправленном поиске секвенированных нуклеотидных последовательностей геномов, представленных в базах данных Broad Institute и GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), представленных в Интернете. С помощью онлайн алгоритма BLASTn осуществлен выбор участков отжига праймеров и зонда в гетерологичных регионах гена *BYS-1 domain-containing protein* и гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы.

Уникальность формирования специфических ампликонов *B. dermatitidis* автор подтвердил с помощью компьютерного моделирования реакции амплификации с использованием онлайн приложения Primer-BLAST, установив, что прямой праймер Bys1F и обратный праймер Bys2R специфически амплифицируют лишь участок гена, кодирующего белок BYS-1, а праймеры BDags-1F и BDags-2R – фрагмент гена  $\alpha$ -1,3-глюкансинтазы.

Специфичность и чувствительность предложенных праймеров и зондов проверена диссертантом в серии экспериментов с использованием чистых культур возбудителя бластомикоза. В результате установлено, что детекция всех штаммов *B. dermatitidis* с помощью праймеров BDags-1F/BDags-2R и зонда BDags-2P в ПЦР в режиме реального времени происходила при концентрации  $\geq 1 \cdot 10^4$  кл/мл, а при использовании праймеров Bys-1F/Bys-2R и зонда Bys-1P – при концентрации  $\geq 1 \cdot 10^5$  кл/мл. В опытах по моделированию бластомикоза на белых мышах ДНК возбудителя бластомикоза методом ПЦР с использованием праймеров BDags1F/BDags2R и флуо-

рессентного зонда BDags-2P удалось выявить у 10 из 32 зараженных мышей. Кроме того, показано, что праймеры BDags-1F/BDags-2R позволяют обнаруживать ДНК микромицета в человеческой крови, искусственно контаминированной взвесью грибных клеток *B. dermatitidis* 6/85 в дрожжевой форме в концентрации от  $1 \cdot 10^4$  кл/мл.

В главе 5 приведены результаты идентификации штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза посредством секвенирования ДНК с использованием праймеров как ранее разработанных в Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте, так и разработанных в процессе диссертационного исследования. Полученные результаты говорят о перспективности технологии секвенирования ДНК с применением праймеров 28S1F/28S1R, детектирующих регион гена 28S *rPHK*, для идентификации возбудителей глубоких микозов и условно патогенных микромицетов.

На основе проведенной работы показана целесообразность дополнения схемы лабораторной диагностики особо опасных микозов этапом секвенирования видоспецифических ампликонов и фрагмента гена 28S *rPHK*.

Выводы и рекомендации диссертанта обоснованы. Список литературы включает достаточное количество работ отечественных и зарубежных исследователей.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы Маркина Александра Михайловича нет. Однако в процессе ознакомления с диссертационным исследованием возник дискуссионный вопрос о влиянии этапа фенольной экстракции, применяемого автором в методиках выделения ДНК, на результаты определения чувствительности ПЦР, поскольку очень вероятны потери некоторого количества ДНК, связанного с интерфазой, что в случае тестирования низкоконцентрированных суспензий микромицетов (от  $10^3$  мк/мл и менее) может приводить к появлению отрицательных результатов амплификации ПЦР-продукта.

Также необходимо отметить некоторые недостатки оформления рукописи, такие как отсутствие единообразия в употреблении знаков «дефис» и «тире».

**Соответствие автореферата основным положениям диссертации.** Авторефе-

рат оформлен в соответствии с требованиями стандарта, а его содержание полностью соответствует основным положениям диссертации и дает полное представления о проделанной работе.

**Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.** По теме диссертации автором опубликовано десять научных работ, соответствующих теме диссертационного исследования. В их числе четыре статьи опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени. В соавторстве издана одна монография. Материалы диссертации представлены и обсуждены на VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии, на Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии, на расширенном заседании специалистов ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

**Заключение.** Диссертация Маркина Александра Михайловича является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, связанной с разработкой системы идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на полимеразной цепной реакции в формате реального времени и секвенирования ДНК, и выполненной лично соискателем на современном методическом уровне. Основные результаты исследования получены лично автором. Полученные материалы репрезентативны, статистически обработаны, тщательно проанализированы, что обеспечило объективность выдвинутых положений и выводов. Выводы, сформулированные автором, обоснованы, подтверждены достоверным материалом, логически вытекают из содержания работы, отражают объем экспериментальных исследований и их уровень. Результаты научных исследований по конструированию амплификационной тест-системы для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза представляют большое значение для медицинской микробиологии и микологии, в частности.

В целом по актуальности исследований, уровню и адекватности методических

приемов, объему и качеству выполненных экспериментов, научной новизне, практической значимости полученных результатов диссертационная работа Маркина Александра Михайловича на тему: «Совершенствование идентификации возбудителей особо опасных микозов на основе молекулярно-генетических методов» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Маркин Александр Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв ведущей организации обсужден и одобрен на заседании ученого совета ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 7 от 12 мая 2016 г.

Заведующий биохимическим отделом Федерального казенного учреждения здравоохранения Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Доктор биологических наук 03.02.03 – микробиология (биологические науки).

*Е.Ю.Марков* –

Марков Евгений Юрьевич

Заведующий отделом микробиологии чумы Федерального казенного учреждения здравоохранения Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Кандидат медицинских наук 03.02.03 – микробиология (медицинские науки)

*М.Ю.Шестопалов*

Шестопалов Михаил Юрьевич

Подписи Е. Ю. Маркова и М. Ю. Шестопалова заверяю:

Начальник отдела кадров и спецчасти института:



Шангареева Наталья Ильинична

664047, Иркутская область, г. Иркутск, ул. Трилиссера, д. 78; Телефон: +7(3952) 22-01-35; Факс: +7(3952) 22-01-40; \* <http://www.irkutsk.ru/chumin>; E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru