

Отзыв

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук МАРКИНА АЛЕКСАНДРА МИХАЙЛОВИЧА
«СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО
ОПАСНЫХ МИКОЗОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МЕТОДОВ» 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы. Возбудителями таких особо опасных инфекций, как кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз, паракокцидиоидомикоз являются грибы, относящиеся ко II группы патогенности. В настоящее время эти микроорганизмы не встречаются на территории РФ. Они часто выявляются в странах Северной, Центральной и Южной Америк, Африки и Юго-Восточной Азии, где ежегодно регистрируют случаи заболеваний.

Активный обмен туристами, рост торгового оборота с рядом государств неблагополучных по микозам делает вероятным случай завоза этих возбудителей в нашу страну.

Возможность аэрогенного пути заражения и отсутствие у человека естественного иммунитета к данным патогенам, определяют возможность использования возбудителей особо опасных микозов в качестве потенциальных агентов биотerrorизма. Кроме того, отсутствие официальных данных о регистрации на территории нашей страны подобных заболеваний может быть обусловлено отсутствием доступных диагностических препаратов, что делает затруднительной выявление этих экзотических для России особо опасных микозов. Эти факты позволяют рассматривать микозы как потенциальные «возвращающиеся патогены», которые при определенных условиях могут вызвать серьезные вспышки и представлять угрозу общественному здравоохранению.

Кроме того, многочисленные исследования свидетельствуют, что подавляющее большинство летальных случаев среди инфицированных возбудителями глубоких особо опасных микозов приходится на пациентов с иммуносупрессией. Учитывая печальный рост подобных состояний в мире и в нашей стране, можно допустить появление еще одной «ниши» для данных возбудителей.

Указанные положения требуют постоянной готовности учреждений здравоохранения к осуществлению своевременной лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых различными видами патогенных грибов.

Грибы, как биологические объекты, отличает ряд уникальных особенностей, поэтому получение ответа с помощью традиционных методов бактериологии, направленных на выделение чистой культуры возбудителей особо опасных микозов, возможно не ранее, чем через 2-3 недели. Иммунологические приемы, столь эффективные в случае других возбудителей, могут обеспечить получение результатов в более короткие сроки, но обладает относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью в связи с перекрёстными реакциями антигенов различных видов непатогенных грибов. Поэтому при получении положительного результата в иммунологических тестах ставят только предварительный диагноз, который требует дальнейшего подтверждения.

Совершенно закономерно, что в настоящее время для диагностики особо опасных микозов все большее применение находят молекулярно-генетические методы, основанные на анализе генома микроорганизма. Однако, встает вопрос правильного выбора мишени. Так, часто используемые мультикопийные гены – *18S rPHK*, *28S rPHK*, *ITS* региона могут амплифицировать ДНК и многих других разновидностей грибов, родов или даже нескольких семейств. Подобное ограничение исключено при

использовании видоспецифических мишеней. В указанном направлении совершенствования приемов молекулярно-биологической диагностики опасных микозов сконцентрированы усилия многих исследователей.

Цель исследования заключалась в разработке системы идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на ПЦР в формате реального времени и секвенировании ДНК. Поставленную автором цель исследования считаю актуальной.

Поставленная цель решена автором путем формулирования и решения четырех задач исследования- анализа нуклеотидных последовательностей с целью подбора перспективных ДНК-мишеней, определения специфичности и чувствительности выбранных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов для ПЦР в режиме реального времени, конструирование амплификационной тест-системы для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза, подбора праймеров для секвенирования рибосомальных генов микромицетов II группы патогенности и оценить разрешающей способности монолокусного секвенирования рибосомальных генов при идентификации возбудителей кокцидиодомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза. Сформулированные задачи позволили автору обеспечить достижение цели исследования.

Диссертация изложена на 130 листах компьютерного текста, иллюстрирована 17 таблицами и 31 рисунком, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, 3-х глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 196 источников, в том числе 27 отечественных и 169 иностранных авторов. Рецензент отмечает использование и современных литературных источников, включая и электронные формы публикаций.

В главе 1 автором проведен анализ данных литературы по современным методам идентификации особо опасных микозов. Рассмотрены вопросы истории обнаружения возбудителей различных микозов, их

таксономического положения и особенностей биологии. Обзор содержит интересные сведения об открытии различных возбудителей, длительном пути их изучения. На конкретных исторических примерах автор показывает, что изучение возбудителей особо опасных микозов затруднено сложностью выделения микроорганизма из окружающей среды, а также трудностью дифференциальной диагностики микозов, особенно вне эндемических очагов. Среди уникальных особенностей биологии возбудителей отмечена роль пыльных бурь и ураганов, когда споры гриба переносятся на большие расстояния.

Факты регистрации случаев кокцидиондомикоза в Австралии, Финляндии, Чехии, Бельгии, Польше, Франции, Новой Зеландии, Соединенном Королевстве, и Японии лишний раз доказывают потенциальную угрозу заноса возбудителя.

Большой раздел главы 1 посвящен анализу данных литературы по амсовременному состоянию патогенеза заболеваний и факторы вирулентности возбудителей особо опасных микозов.

Автором обобщены данные литературы, показавшие что основные механизмы развития заболеваний заключаются во взаимодействии факторов патогенности грибов с иммунной системой. Отмечена важность гликопротеиновых молекул мембран и клеточных стенок микромицетов, обладающих уникальным для грибов строением и не встречающимися в клетках хозяина: хитина (полимера N- ацетилглюкозамина), α - и β -глюканов (полимеров глюкозы), маннанов (цепи N- или O-связанных молекул маннозы). Важным для развития патогенетического процесса является наличие набора ферментов, например, 4-гидроксилфенилпируватдиоксигеназы, орнитиндекарбоксилазы, α -1,3-глюкансинтазы и других, способных расщепляющими человеческие иммуноглобулины, гемоглобин, эластин и ткани в месте внедрения возбудителя. Приведены сведения, о генах, детерминирующих продукцию

факторов вирулентности. Данный раздел логичен, поскольку гены, детерминирующие факторы патогенности и отвечающие за биологические особенности жизненного цикла микромицетов, являются первыми кандидатами в качестве мишней для разработки систем молекулярной диагностики и идентификации.

Далее автор проанализировал современное состояние проблемы лабораторной диагностики особо опасных микозов, основанной на выделении чистой культуры возбудителя с доказательством его двухфазности, обнаружении антигенов и антител, а также выявлении ДНК. Первым этапом является микроскопическое исследование, которое с одной стороны быстро и дешево, но требует большого опыта. Следующим этапом лабораторного анализа, независимо от результатов микроскопического исследования, является получение чистой культуры предполагаемого возбудителя. Это наиболее важный шаг для определения видовой принадлежности исследуемого микроорганизма требующий использования специализированных сред, необходимых для формирования органов спороношения, спор и уникальных образований мицелия.

Поскольку для мицелиальной фазы возбудителей особо опасных микозов характерна низкая биохимическая активность, то методы ее анализа не нашли широкого применения. Отмечено, что иммунологические методы диагностики недостаточно эффективны для идентификации микромицетов и постановки клинического диагноза, вследствие наличия сходных антигенных структур у других близкородственных и менее патогенных грибов.

Поэтому отрицательные результаты в иммунологических тестах не исключают диагноз микоза, а положительные результаты требуют дополнительных культуральных исследований. Приведенные сведения позволяют согласиться с мнением автора, что существующие методы обнаружения патогенных микромицетов недостаточно эффективны для ускоренной диагностики.

Заключительный раздел главы посвящен анализу использования молекулярно-генетических методов исследования возбудителей особо опасных микозов. Важность этой задачи доказывает существование проекта Fungal Genome Initiative (FGI) по секвенированию и анализу геномов наиболее широко распространенных патогенных грибов среди которых одно из первых мест занимают возбудители особо опасных микозов.

В последние годы для идентификации возбудителей глубоких микозов используют молекулярно-генетические подходы. В качестве мишений используют уникальные последовательности генов *18S* и *28S* рибосомальной РНК, ITS-региона что позволило в некоторых случаях достичь 100 % специфичности. Любимой ДНК-мишенью часто являются мультикопийные гены, такие как *18S pPHK*, *ITS* – регионы или *28S pPHK* поскольку сотни копий этих генов в геноме гарантируют высокую чувствительность ПЦР – исследования. Однако поскольку рибосомальные гены консервативны, то необходим большой объем работы по выявлению специфичных для данного вида участков ДНК. Кроме того, перспективным направлением генодиагностики является поиск видоспецифических фрагментов генов, детерминирующих продукцию специфических белков и различных факторов патогенности. Так, для идентификации и дифференциации возбудителя кокцидиоза сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт были выбраны участки гена *MVR-1*, детерминирующего макрофагсвязывающий белок, и гена *SOWgp82*, кодирующего иммунодоминантный гликопротеин внешней стенки сферул. Для возбудителя гистоплазмоза такими целевыми последовательностями являются гены, определяющие экспрессию 100-кДа белка, М-антитела и Н-антитела. Для идентификации этого возбудителя сотрудниками ФКУЗ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт сконструирована амплификационная тест-система, где в качестве мишней используют последовательности генов, кодирующих белки CBP1 и MS8.

С целью увеличения специфичности реакции амплификации предложена двухстадийная (nested) ПЦР на основе гена, детерминирующего продукцию поверхностного протеина сферул, богатого пролином — Ag2/PRA, а для *B.dermatitidis* предложены праймеры детектирующие наличие генов *18S RHK* и *BADI*. Однако, как справедливо замечает автор основным недостатком применения данного формата ПЦР является высокий риск контаминации проб на втором этапе постановки реакции.

В настоящее время для лабораторной диагностики все шире используют ПЦР в режиме реального времени. Данный метод основан на выявлении специфических продуктов ПЦР посредством измерения уровня флуоресцентного сигнала после завершения каждого цикла амплификации. проводится в закрытом формате.

Другой активно развивающейся технологией в области идентификации микроорганизмов является метод секвенирования ДНК, основанный определении первичной последовательности ДНК и дальнейшем анализе полученных данных путем сравнения с секвенированными последовательностями представленными в генетических базах данных. И в этом случае автор на реальных примерах, описанных в современной научной литературе обосновывает целесообразность проведения последующей работы.

Глава 2 описывает методологию и методы исследования. В работе использованы широкий спектр экспериментальных методов исследования: микробиологических (культивирование микроорганизмов на специализированных питательных средах), микроскопических (световая микроскопия с подробнейшим описанием особенностей морфологии

микроорганизмов) и биологических (моделирование инфекций на лабораторных животных).

Работа выполнена на большой коллекции штаммов: 3 штамма *B.dermatitidis*, 6 штаммов *C.immitis*, 2 штамма *C.posadasii*, 8 штаммов *H.capsulatum var capsulatum*, 3 штамма *H.capsulatum var. duboisii* и 1 штамм *H.capsulatum var. farciminosum*. В дополнение к этому использовались также 20 штаммов возбудителей оппортунистических микозов.

Подробно описано использование коммерческой тест-системы AUXACOLOR 2 для изучения биохимической активности возбудителей особо опасных микозов основанного на способности микромицетов ассимилировать сахара (глюкозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, лактозу, раффинозу, инозитол, целлобиозу, трегаллозу, адонитол, мелецитозу, ксилозу, арабинозу) и проявлять некоторые виды ферментативной активности (Н-ацетилгалактозаминидазную, фенолоксидазную и пролинариламинидазную).

Подробнейшим образом описаны приемы молекулярной биологии: подготовка биологического материала для ПЦР-анализа, включая приемы гуанидинтиоцианат-фенольной экстракции с переосаждением ДНК изопропанолом и с нуклеосорбцией, проведения ПЦР в режиме реального времени и с электрофоретическим учетом результатов, секвенирования.

В целом для достижения поставленной задачи автор использовал весь арсенал, как традиционных методов бактериологии, так современных методов молекулярной биологии.

Глава 3 посвящена идентификации возбудителей кокцидиомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза на основе культурально-морфологических и биохимических признаков. При этом в качестве основного диагностического

критерия использовали морфологические характеристики штаммов исследуемых микроорганизмов так как каждый вид микромицетов обладает набором специфических признаков, по которым возможно провести идентификацию. Данный этап работы проводили с использованием менее патогенных близкородственных штаммов возбудителей оппортунистических микозов. Результаты микроскопического исследования возбудителей особо опасных и некоторых оппортунистических микозов выявили схожесть их морфологических структур, что указывало на необходимость применения дополнительных методов идентификации.

Далее автор предпринял попытку изучения возможности идентификации возбудителей особо опасных микозов с помощью колориметрической тест-системы AUXACOLOR II, основанной на анализе ферментативной активности. Полученный результат однозначно указывал, что данная система не может быть использована для достоверной идентификации возбудителей особо опасных микозов.

Можно согласиться с выводом автора, сделанным по итогам этого раздела, что методы идентификации микромицетов, основанные на определении фенотипических признаков не обеспечивают получения достоверного результата. Это связано с высокой степенью вариабельности фенотипических свойств возбудителей особо опасных микозов. Этот вывод обосновал последующую работу автора, описанную в главе 4 посвященную сконструированию ПЦР тест-системы для обнаружения возбудителя бластомикоза и созданию набора праймеров для секвенирования.

Первым этапом был выбор участков гена *BYS-1*, кодирующего белок, активно экспрессирующийся в дрожжевой фазе роста *B. dermatitidis*, и гена а-1,3-глюкансинтазы, ответственного за формирование клеточной стенки микромицетов. Выбор данных генов проведен на основе анализа соответствующей литературы и целенаправленного поиска секвенированных нуклеотидных последовательностей геномов, представленных в базах данных

Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>) и GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с использованием современных приемов биоинформационного анализа.

На основе гена *BYS-1* сконструирован зонд Bys-1P к участку, амплифицируемому парой праймеров Bys-1F и Bys-2R. Для обеспечения флуоресцентной детекции результатов при проведении ПЦР в реальном времени, нацеленной на последовательность гена α -1,3-глюкансинтазы, автором сконструирован зонд BDags-2P, используемый с праймерами BDags-1F/BDags-2R.

Оба зонда были мечены с 5'-конца флуоресцентной меткой FAM, с 3'-конца — молекулой гасителя флуоресценции BHQ1. Специфичность праймеров и зондов проверяли с использованием *on-line* приложения BLASTn и программы Ugene. Результаты моделирования свидетельствовали об их высокой специфичности двух сконструированных систем.

В последующем автором была проведена оптимизация условий для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на препаратах ДНК штаммов возбудителя бластомикоза и подобраны оптимальные соотношения реагентов (солей магния) и условий проведения реакции на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия).

В ходе проверки чувствительности и специфичности сконструированных праймеров и зондов для обнаружения возбудителя бластомикоза на модели чистых культур установлено, что порог чувствительности реакции амплификации, при котором происходила детекция всех штаммов *B. dermatitidis* с помощью праймеров BDags-1F/BDags-2R и зонда BDags-2P, составил 1×10^4 кл/мл. Для праймеров Bys-1F/Bys-2R и зонда Bys-1P предел обнаружения был на уровне 1×10^5 кл/мл.

Оценка специфичности праймеров и зондов с ДНК была проведена на модели гетерологичных видов микроорганизмов. При проведении реакции

амплификации с пробами чистых культур микромицетов родов *Coccidioides spp.*, *Histoplasma spp.*, и микромицетами III-IV групп патогенности были использованы взвеси микромицетов в концентрации 1×10^7 кл/мл. Во всех случаях были получены отрицательные результаты, что явилось свидетельством высокой специфичности используемых систем и подтвердило результаты анализа *in silico* осуществленного автором ранее. Вполне закономерен вывод автора, что достигнут достаточный уровень чувствительности и специфичности сконструированных наборов реагентов для амплификации специфических регионов генов *BYS-1* и α-1,3-глюкансигнатазы, соответствующих общепринятым требованиям к разрабатываемым амплификационным тест-системам.

Учитывая полученные результаты совершенно логично проведение следующего этапа работы- использование разработанных систем для обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции. В результате предварительных опытов установлено, что праймеры BDags-1F/BDags-2R способны детектировать ДНК микромицета в крови в концентрации от 1×10^4 кл/мл.

Опыты проводили на белых мышах, отбор секционного материала осуществляли на 7, 14, 21 и 28 сутки после заражения. Исследование биологических проб с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили параллельно с культуральным (микологическим) методом. При исследовании проб секционного материала, полученного от зараженных белых мышей, результаты ПЦР и микологического метода совпали в 53% случаев. Следует отметить, что микологическим методом не удалось выявить возбудитель бластомикоза в крови зараженных животных. При исследовании органов интактных белых мышей (контрольная группа) микологическим методом и ПЦР получены отрицательные результаты.

Математический анализ результатов показал отсутствие статистической значимости различий в эффективности используемых методов . Однако

микологический метод потребовал значительно больше времени для исследования. Видимый рост микромицета наблюдался только на 10-14 сутки после взятия материала на исследование. Еще 7-10 суток потребовалось на появление морфологических признаков, с помощью которых можно было провести идентификацию выросшего микроорганизма. Также на результаты ПЦР не влияла возможная контаминация проб посторонней микрофлорой.

Результаты представленных исследований указывают на принципиальную возможность применения полимеразной цепной реакции для обнаружения ДНК *B.dermatitidis*. Показана более высокая информативность ПЦР при анализе образцов крови, в сравнении с микологическим методом, что в реальных условиях может позволить обнаружить возбудитель в ранние сроки заболевания.

Заключительная глава диссертации посвящена использованию приема секвенирования для идентификации возбудителей особо опасных микозов.

Попытки провести секвенирование нуклеотидных последовательностей музейных штаммов возбудителей особо опасных микозов с помощью видоспецифических праймеров, сконструированных ранее авторами не увенчались явным успехом. Секвенирование музейных штаммов микромицетов II-IV гр. патогенности с помощью коммерческого набора для секвенирования ДНК микромицетов D2LSU Kit в целом показало положительные результаты. Однако ряд ограничений, таких как необходимость высокой концентрации ДНК в пробе для процедуры амплификации, отсутствие данных о последовательностях праймеров, высокие требования к наборам для выделения ДНК и используемым амплификаторам, для которых сконструирована данная тест-система, на взгляд автора, указывает на необходимость создания отечественного аналога.

Поэтому для конструирования секвенационных праймеров, после подробного анализа имеющихся в литературе данных, автором выбран рибосомальный ген L23, кодирующий рибосомальный белок L14p/L23e,

который отнесен к семейству РНК-связывающих протеинов. Сконструированные праймеры L23F/L23R отвечали всем заданных характеристикам и были проверены на 14 штаммах возбудителей особо опасных микозов из коллекции живых культур ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института.

С помощью секвенирования рибосомального гена *L23* все исследуемые штаммы возбудителей особо опасных микозов разделены на 3 кластерные группы, соответствующие изучаемым видам особо опасных микромицетов. Результаты исследования демонстрируют эффективность видовой идентификации возбудителей особо опасных микозов. Однако секвенирование данного локуса не позволило разделить варианты *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* и *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*.

Тем не менее можно согласиться с выводом автора, что несмотря на то, что для идентификации широкого спектра микромицетов данные праймеры недостаточно информативны, они могут быть использованы для дополнительного подтверждения принадлежности исследуемой культуры к группе возбудителей глубоких особо опасных микозов.

Далее для идентификации качестве ДНК - матрицы дополнительно выбран участок генов *28S rPHK*. С помощью компьютерного анализа было выбрано и проанализировано несколько пар праймеров. Олигонуклеотидные затравки 28S1F/28S1R, выбранные на основе последовательностей генов *28S rPHK*, были общими для всех возбудителей особо опасных микозов. Более того, результаты анализа *in silico* свидетельствовали о высокой консервативности выбранного региона. Поэтому на их основе было проведено секвенирование последовательностей микромицетов III-IV групп патогенности.

Полученные в ходе эксперимента данные с праймерами 28S1F/28S1R совпали с результатами эксперимента с использованием праймеров

L23F/L23R. На основе секвенирования фрагмента гена 28S РНК возбудителей особо опасных микозов, исследуемые микроорганизмы удалось разделить на три группы, согласно родовой принадлежности. Необходимо отметить, что с помощью праймеров 28S1F/28S1R методом секвенирования возможно разделение вариантов *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* и *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

Рецензент полностью разделяет мнение автора, что конструирование секвенционной системы на основе данных праймеров позволит повысить возможности диагностических центров и, в первую очередь, Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов, при идентификации возбудителей различных микотических инфекций человека, животных и растений и о необходимости дополнения схемы лабораторной диагностики особо опасных микозов этапом секвенирования.

В Заключении автор подвел итог проведенной работы и обрисовал перспективы внедрения полученных результатов в практику.

Приведенные фактические экспериментальные результаты позволяют сделать вывод о доказанности четырех основных положений диссертации, вынесенных на защиту. Диссертант сформулировал шесть выводов, которые обосновывают защищаемые позиции. Выводы четко сформулированы. Работа написана хорошим литературным языком, практически без ошибок, легко читается. Иллюстративный материал (таблицы и рисунки) доказывает полученные результаты.

Оценка новизны и достоверности. На взгляд рецензента новизну полученных данных доказывают две сконструированные тест-системы для проведения ПЦР в реальном времени для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза и результаты их использования на модели чистых культур и экспериментальной инфекции. Показано, что сочетание реакции амплификации и последующего секвенирования участков гена *CBP-1* и фрагментов генов *BYS-1* и α -1,3-глюкансинтазы *B.dermatitidis* повышают

достоверность идентификации возбудителей кокцидиомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза.

В работе впервые представлены данные об эффективности идентификации возбудителей особо опасных микозов при использовании секвенирования фрагментов гена *28S rRNA* и гена рибосомального белка *L23*. На основе полученных данных предложено дополнить схему лабораторной диагностики особо опасных микозов дополнена этапом секвенирования при идентификации чистых культур микромицетов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Диссертационная работа выполнена во ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках двух плановых НИР:054-5-10 «Выявление возбудителей особо опасных микозов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов» и 067-6.7-11 «Разработка тест-систем для молекулярно-генетической детекции возбудителей особо опасных микозов на основе ПЦР».

Результаты исследования получены с использованием современного сертифицированного и прошедшего метрологическую проверку оборудования, с последующей статистической обработкой и научным анализом полученных данных.

Материалы диссертации были представлены на VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва 2014), на Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург 2014), на расширенном заседании специалистов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в декабре 2015 года

Практическая значимость работы. Материалы исследования вошли в проекты методических указаний «Лабораторная диагностика особо опасных микозов» и «Методические указания по порядку проведения лабораторной диагностики особо опасных микозов в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней», подготовленные для утверждения в Роспотребнадзоре.

Они включены в лекционный материал, предназначенный для врачей и лаборантов учреждений санитарно-эпидемиологического профиля и клинических диагностических лабораторий, при реализации основных образовательных программ послевузовского профессионального образования (аспирантура) и дополнительных профессиональных образовательных программ (профессиональная переподготовка и повышение квалификации специалистов) по лабораторной микологии.

Личный вклад соискателя Автором проведён анализ отечественной и зарубежной литературы, сформулированы цель, задачи, этапы и методы исследования, научные положения, выносимые на защиту, выводы. Проведена статистическая обработка обобщенного материала.

В четырех опубликованных работах Александр Михайлович является первым автором.

Публикации. По материалам исследования опубликовано 10 печатных работ, отражающих основное содержание работы, в том числе 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, издана 1 монография.

Автореферат написан грамотно, отражает основные положения выносимые на защиту и обосновывает сделанные автором выводы. Иллюстрации наглядны и информативны.

Замечания. Принципиальных замечаний нет.

Иногда автор использует разную номенклатуру. Так, во всем тексте речь идет о сконструированных тест-системах для проведения ПЦР, а на стр. 71 автор использует термин «набор реагентов». К сожалению в отличном

обзоре литературе не указано, имеют ли описанные наборы для проведения ИФА государственную регистрацию.

В тексте диссертации отсутствует раздел о личном вкладе автора.

Не понятно как автор будет защищать свой приоритет. Сконструированы наборы для тест-системы для проведения ПЦР в реальном времени для обнаружения ДНК возбудителя бластомикоза, но отсутствуют сведения о патентовании. Диссертация размещена в открытом доступе, структура праймеров и зондов открыта. Хотелось бы получить пояснение автора. Это замечание также касается и системы двух пар праймеров для проведения секвенирования рибосомальных генов. Так же отсутствуют сведения о государственной регистрации разработанных автором препаратов. Может быть автор полагает достаточным упоминание в документах федерального уровня по лабораторной диагностике, представленных на утверждение.

На взгляд рецензента следует более осторожно говорить о дополнении схемы диагностики этапом секвенирования как свершившимся фактом, поскольку материалы вошли в проекты методических указаний «Лабораторная диагностика особо опасных микозов» и «Методические указания по порядку проведения лабораторной диагностики особо опасных микозов в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней», подготовленные для утверждения в Роспотребнадзоре, но еще юридически не утверждены. Рецензент понимает, что данные сомнения рецензента выходят за пределы компетенции автора данной работы.

Высказанные замечания не снижают положительного впечатления от рассматриваемой работы.

На основании изучения работы рецензент делает вывод, что по своей актуальности и новизне, объему проведенных исследований, методическому уровню решения ее задач, научно-практической значимости полученных результатов представленная МАРКИНЫМ АЛЕКСАНДРОМ

МИХАЙЛОВИЧЕМ диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ» 03.02.03 – микробиология полностью соответствует требованиям п. 9 положения ВАК «О порядке присуждения ученых степеней и званий...» (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор МАРКИН АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующий лабораторией ФКУЗ «Ростовский научно-исследовательский противочумный институт»

д.м.н.

Водопьянов С.О.

Подпись заведующего лабораторией биохимии Водопьянова С.О.

«ЗАВЕРЯЮ»

Начальник отдела кадров ФКУЗ «Ростовский научно-исследовательский противочумный институт»

Стоян Е.Е.

30.05.2016.

