

Отзыв официального оппонента на диссертацию

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 темы диссертации

К микроскопическим грибам II группы патогенности относятся представители родов *Coccidioides* (*Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*), *Histoplasma* spp. (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Histoplasma capsulatum* var. *farcinosum*) и *Blastomyces* (*Blastomyces dermatitidis* и *Blastomyces gilchristii*). Они способны вызывать особо опасные инфекции - кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, бластомикоз, паракокцидиоидомикоз, в основном, в странах Азии, Африки и на американском континенте. Однако, активные международные туристические, торговые и тому подобные связи Российской Федерации со странами, эндемичными по этим инфекциям, обуславливают реальную вероятность завоза этих микозов и риска заражения граждан России.

В связи с вышеизложенным, необходима качественная и своевременная лабораторная диагностика указанных заболеваний, в том числе, конструирование современных эффективных диагностических наборов и тест-систем для идентификации возбудителей глубоких особо опасных микозов, поскольку традиционно используемый микологический метод длителен и трудоемок, а иммунодиагностика недостаточно чувствительна и специфична. Как и в случаях многих других инфекций, для лабораторной диагностики микозов очень перспективна разработка методов, основанных на анализе структуры этих патогенов.

В свете вышеизложенного заявленная цель рецензируемого исследования - «разработка системы идентификации возбудителей особо опасных микозов, основанной на ПЦР в формате реального времени и секвенирования ДНК» - представляется безусловно актуальной.

Степень обоснованности научных исследований, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа А.М. Маркина представляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком научно-методическом уровне. Обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций подтверждают объективные экспериментальные данные, корректно проанализированные теоретические сведения.

Значительный объём исследований, проведенных при использовании адекватных современных методов (микробиологических, молекулярно-генетических, микологических, компьютерных) позволили последовательно решить стоявшие перед автором задачи, а также обосновать все выдвинутые на защиту положения, выводы и рекомендации.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Степень достоверности результатов исследования основывается на использовании большого фактического материала, полученного в повторяющихся экспериментах и подвергнутых статистической обработке. Достоверность результатов исследования подтверждается табличными и графическими данными, грамотной интерпретацией и, поэтому, не вызывает сомнений. Новизна результатов и выводов не противоречит основным сведениям, полученным ранее другими авторами.

Кратко, научная новизна заключается в следующем. Разработаны и апробированы олигонуклеотидные праймеры, специфичные для гена *-1,3-*глюкансинтазы возбудителя бластомикоза, при помощи которых можно эффективно идентифицировать культуры и детектировать ДНК гриба в искусственно контаминированных *B.dermatitidis* пробах, а также биологическом материале от экспериментально зараженных лабораторных

животных. Экспериментально доказано, что сопряженное использование реакции амплификации и последующее секвенирование фрагментов гена макрофагсвязывающего белка *C.immitis* и *C.posadasii*, участков гена кальций-связывающего протеина СВР-1 *H.capsulatum*, а также фрагментов генов ВУС-1 и гена -1,3-глюкансинтазы *B.dermatitidis* повышает достоверность идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза. Продемонстрирована эффективность идентификации возбудителей особо опасных микозов с помощью определения первичной нуклеотидной последовательности участков гена 28S рРНК и гена рибосомального белка L23. Полученные результаты позволили рекомендовать дополнение схемы лабораторной диагностики особо опасных микозов этапом секвенирования при идентификации чистых культур микромицетов.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендация

Материалы диссертационного исследования позволили рекомендовать использование способа амплификации фрагментов выбранных и апробированных генов возбудителей особо опасных микозов (МВР-1 *Coccidioides spp.*, СВР-1 *Histoplasma spp.*, ВУС-1 и гена -1,3-глюкансинтазы *Blastomyces spp.*), а также секвенирование фрагмента гена 28S рРНК и участка гена рибосомального белка L23 для использования в Референс-центре по мониторингу за возбудителями глубоких микозов и в лабораториях Волгоградского НИПЧИ для анализа генетических особенностей штаммов микромицетов II группы патогенности.

Результаты работы А.М.Маркина, 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.

Сконструированные тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени могут применяться в диагностических лабораториях учреждений Роспотребнадзора, Минздрава и других ведомств для выявления возбудителей особо опасных микозов.

Материалы диссертации используются при чтении лекций на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей и биологов по особо опасным инфекциям при ФКУЗ ВолгНИПЧИ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 листах компьютерного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка принятых сокращений а также списка использованной литературы, включающего 196 источников, в том числе 27 отечественных авторов. Текст иллюстрирован 17 таблицами и 31 рисунком. Исследования выполнены в рамках плановых НИР Волгоградского НИПЧИ: 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». Материалы исследований А.М.Маркина были доложены на ряде научных конференций различного уровня. По теме диссертации опубликовано 10 работ, 4 из которых – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Содержание диссертации, её завершённость

Во введении автором обоснованы актуальность исследования, сформулированы цель и четыре задачи исследования. Приведена основная информация по результатам работы, новизне, теоретической и практической значимости, степени достоверности и апробации. Четыре положения,

выносимые на защиту, отражают основные итоги исследования. Описана структура диссертации, дана информация о публикациях.

В четырех разделах первой главы диссертационной работы (обзоре литературы) рассмотрены данные научных публикаций, касающиеся разных аспектов исследуемой проблемы. Изложены сведения по таксономии и биологическим характеристикам возбудителей особо опасных микозов, в том числе, вирулентным свойствам. Далее обсуждаются вопросы лабораторной диагностики, включая молекулярно-генетические подходы к идентификации и изучению свойств возбудителей особо опасных микозов.

Материал изложен кратко, но достаточно информативно, с необходимыми элементами анализа. На наш взгляд, однако, не укладываются в контекст диссертационной темы представленные автором сведения (впрочем, немногочисленные) по патогенезу микотических заболеваний.

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление о том, что автором использованы как методы классической микробиологии (культивирование микроорганизмов на питательных средах различного состава, методы культурально-морфологического изучения и исследования биохимической активности, определение вирулентности тестируемых штаммов, статистическая обработка), так и самые современные методические подходы (реакция амплификации, генетическое зондирование, определение первичной нуклеотидной последовательности). Не совсем понятно, однако, использование *двух* методов для выделения ДНК микромицетов: с переосаждением ДНК изопропанолом и экстракцией с последующей нуклеосорбцией. Работа была проведена с использованием более 40 штаммов возбудителей микозов, двадцать из которых – особо опасные.

Глава 3 - «Идентификация возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза на основе культурально-морфологических и биохимических признаков». В ней представлены подробные характеристики взятых в эксперимент штаммов, поскольку разные виды микромицетов

обладают набором специфических признаков, по которым возможно провести их идентификацию. Учитывая сложности идентификации микромицетов на основе анализа макро- и микроморфологических признаков для дифференциации возбудителей особо опасных микозов на основе ферментативных свойств А.М.Маркин успешно использовал автоматизированную систему AUXACOLOR 2, которая позволяет определить способность дрожжевых и дрожжеподобных микромицетов ассимилировать различные сахара и которая ранее для этих целей на данных микробиологических моделях не применялась.

В главе 4 подробно описаны все этапы конструирования амплификационной тест-системы с детекцией результатов в режиме реального времени для выявления ДНК возбудителя бластомикоза, начиная с выбора ДНК – матриц (участки гена *BYS-1*, кодирующего белок, активно экспрессирующийся в дрожжевой фазе роста *B.dermatitidis* и гена *-1,3-глюкансинтазы*, ответственного за формирование клеточной стенки микромицетов), далее - конструирования, анализа структуры, определения чувствительности и специфичности праймеров и зондов, подбора оптимальных условий проведения реакции и заканчивая успешным использованием полимеразной цепной реакции для обнаружения возбудителя бластомикоза при экспериментальной инфекции.

В главе 5 приведены результаты разработки секвенационных подходов для идентификации возбудителей особо опасных микозов. Вначале было проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей музейных штаммов этих патогенов при помощи видоспецифических праймеров. Далее были секвенированы: ген рибосомального белка L23 возбудителей кокцидиоидомикоза, гистоплазмоза и бластомикоза и ген 28S рРНК штаммов возбудителей глубоких микозов. В итоге данного этапа работы было показано, что сочетание реакции амплификации с секвенированием фрагментов выбранных автором генов кокцидий, гистоплазм и бластомицетов (соответственно МВР-1, СВР-1 и - *-1,3-глюкансинтазы* и

ВУС-1) повышает достоверность ПЦР-диагностики и обеспечивает корректную идентификацию перечисленных возбудителей. Для идентификации микромицетов II-IV групп патогенности подобраны олигонуклеотидные затравки для секвенирования фрагмента гена рибосомального белка L23 и участка гена 28S рРНК. Полученные сведения позволили усовершенствовать схему лабораторной диагностики особо опасных микозов с включением этапа секвенирования видоспецифических ампликонов и фрагмента гена 28S рРНК.

В «Заключении» кратко подведены итоги работы, приведены обобщающие материалы по трём главам собственных исследований, подведены итоги, изложены рекомендации. Однако, перспективам дальнейших исследований *по выбранному автором направлению* уделено, на наш взгляд, недостаточное внимание.

Шесть выводов диссертации основываются на представленном экспериментальном материале и логически завершают проделанную работу.

Все вынесенные на защиту положения нашли своё отражение в соответствующих публикациях. Поставленные задачи решены, цель исследования достигнута. Диссертация носит, таким образом, завершённый характер. Автореферат полностью отражает основные материалы диссертации.

Положительно оценивая работу в целом и подчёркивая её новизну и значимость для науки и практики, хотелось бы получить ответ на существенный вопрос, который возник при анализе материалов диссертационной работы. В связи со сделанными автором рекомендациями по практическому использованию созданных диагностических тест-систем: предполагается ли их производство; на какой стадии внедрения они находятся?

Естественно, работа не лишена недостатков, в основном, редакционно-стилистического плана. В качестве примеров можно привести следующие.

1. В формулировке второй задачи имеется «биологически» некорректное словосочетание: гетерологичные штаммы. Гетерологичны – бактериальные *виды*.
2. В автореферате чрезмерно объемён раздел «Материалы и методы» - 4 страницы из 24, шестая часть! Рациональнее было больше места уделить изложению результатов собственных исследований, а описание используемых методов сократить до *возможного* минимума.
3. В разделе «Конструирование амплификационной тест-системы... для выявления возбудителя бластомикоза вначале постулируется, что размер ампликона должен укладываться в интервал 50-300 н.п. (стр. 61). Однако, в таблице 5 указан более высокий размер одного из ампликонов – 306 н.п. Техническая ли это погрешность или несоблюдение параметров установленных для своих экспериментов?

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации. Научные положения, выводы и рекомендации обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Заключение

Все изложенное выше позволяет заключить, что диссертация А.М.Маркина «Совершенствование идентификации возбудителей особо опасных микозов на основе молекулярно-генетических методов» выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-исследовательской квалификационной работой, в основу которой положен большой фактический материал по разработке перспективного направления – совершенствованию схемы_идентификации возбудителей особо опасных микозов с применением молекулярно-генетических методов. Соответствие рецензируемого исследования специальности 03.02.03 «микробиология» убедительно обосновано целью, задачами, методическими подходами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами.

В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её разрешению, научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., как завершенная научно-квалификационная работа, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в области микробиологии, а её автор – Александр Михайлович Маркин - заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Попов Юрий Алексеевич,
доктор биологических наук, профессор
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт "Микроб»,
отдел образовательных программ
и подготовки специалистов, заведующий отделом
410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел. 845-2-51-52-30; E-mail – rusrapi@microbe.ru

Подпись заведующего отделом, профессора Ю.А. Попова

Заверяю

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Российского научно-исследовательского
противочумного института "Микроб»



Е.Ф.Шамшурина