

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Шарова Тимура Николаевича** «Разработка алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования *Coccidioides* spp. с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Несмотря на то, что до настоящего времени на территории Российской Федерации не было зарегистрировано ни одного случая заболевания кокцидиомикозом, риски заносов его возбудителей из эндемичных стран вполне реальны. Кроме того, зарубежные авторы упоминают, что у 60% инфицированных людей клинические симптомы отсутствуют либо напоминают ОРЗ, поэтому нельзя полностью исключить, что отсутствие выявления этих микромицетов не связано с недостатками диагностики. Повышенная миграция населения (туризм, коммерция, торговля и т.п.) уже не раз приводила к заносам возбудителей в неэндемичные страны Европы и Азии, где они не укоренились лишь благодаря тому, что человек и животные являются для них «биологическими тупиками». Вместе с тем, заносы возможны за счет импорта сельхозпродуктов, получения из-за рубежа органов для трансплантации и, наконец, биотерроризма. Поэтому отечественная медицина должна быть готова к проведению экстренной индикации возбудителей и их дифференциации по степени опасности. На сегодняшний день разработкой диагностических препаратов занимаются в основном специалисты США и некоторых государств Латинской Америки, тогда как в России, судя по имеющимся публикациям, исследования в этом направлении проводятся лишь в Волгоградском противочумном институте. Представленная к защите диссертационная работа Т.Н.Шарова бесспорно актуальна и отражает основные достижения в данной области.

Цель работы заключалась в разработке алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования видов *Coccidioides* на основе сравнительного анализа MALDI-TOF масс-спектров клеточных белков.

В соответствии с целью автором поставлены 4 задачи, которые успешно решены в процессе выполнения работы.

Научная новизна представленных в диссертации результатов несомненна. Она состоит прежде всего в разработке раздела электронной базы данных MALDI-TOF спектров SARAMIS™, включающего ранее отсутствовавшие в ней и полученные автором референтные масс-спектры *Coccidioides* spp., необходимые для их идентификации и типирования. Эти данные также включены в паспорта всех штаммов *Coccidioides* spp., имеющихся на сегодняшний день в коллекции Волгоградского противочумного института (единственной в России).

Практическая значимость работы заключается в разработке комплекса методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии клеток *Coccidioides* spp., относящихся ко II группе патогенности, и алгоритмов экспресс-идентификации и типирования видов возбудителя, что позволяет дополнить схемы молекулярного типирования возбудителей особо опасных микозов на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности. Материалы исследований уже были включены в ряд методических указаний федерального уровня и нормативно-методические документы учрежденческого уровня внедрения. Паспортизованные штаммы и их масс-спектры могут быть использованы в качестве эталонных при идентификации штаммов этих патогенных микромицетов в случаях их выделения на территории России.

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 120 страницах и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований (включая главу с описанием материалов и методов), заключения, выводов и списка литературы, содержащего 165 работ, из них 2 отечественных и 163 зарубежных. Текст иллюстрирован 6 таблицами и 20 рисунками.

Во **введении** убедительно показана актуальность проблемы, а также приведена основная информация по результатам диссертационного исследования. Четыре положения, выносимые на защиту, отражают основные результаты и достижения работы.

В **обзоре литературы** приведены данные о распространении кокцидиоидомикозов в мире, клинике и эпидемиологии заболевания, источниках заражения и особенностях жизненного цикла возбудителей, а также используемых в настоящее время методах их идентификации и типирования, проанализированы их достоинства и недостатки. Поскольку в литературе практически отсутствуют сведения об использовании метода MALDI-TOF конкретно для исследования *Coccidioides* spp., соискателю пришлось изучить множество опубликованных данных, полученных на представителях других родов и видов микромицетов. Глубокий анализ «сильных и слабых звеньев» этих методических подходов позволил ему избежать возможных проблем и найти наиболее адекватный алгоритм при решении собственных задач.

Глава 2 – Материалы и методы позволяет составить представление о высоком методическом уровне диссертационной работы. Все методики изложены подробно и достаточно четко, с объяснениями особенностей каждого этапа, что свидетельствует о высокой квалификации автора в области масс-спектрометрии, умении самостоятельно осуществлять калибровку масс-спектрометра и последующую экспериментальную работу, а также проводить сравнительный анализ с помощью компьютерного программного обеспечения. К сожалению, в этой главе не приводятся сведения о происхождении исследуемых штаммов (источник, место и время выделения) и о том, какими методами была подтверждена их видовая принадлежность при поступлении в Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов при Волгоградском противочумном институте.

Тимур Николаевич начал собственные исследования с отработки методов подготовки проб для масс-спектрометрического анализа, что нашло от-

ражение в **главе 3**. Основное внимание его было сосредоточено на достижении сочетания эффективного обеззараживания возбудителя с максимально высоким качеством результатов масс-спектрометрии и их воспроизводимости. После апробации ряда описанных в литературе методов, применявшихся для других микромицетов, автор пришел к заключению о необходимости внесения собственных модификаций с целью адаптации к работе с *Coccidioides* spp. как возбудителями особо опасных микозов. В итоге была отработана оптимальная схема, отвечающая поставленной задаче. Авторский метод подробно описан, но, к сожалению, в этой главе не указано, на какой среде выращивали культуры на этапе его отработки. На наш взгляд, более логично было бы включить раздел по подбору оптимальной среды и условий культивирования (4.2) в третью главу, а не в четвертую. Также было бы желательно указать, имелись ли межвидовые и межштаммовые различия по культуральным свойствам при выращивании на разных средах.

Глава 4 посвящена собственно получению и сравнительному анализу масс-спектров возбудителей кокцидиоидомикоза. Обращает на себя внимание большой объем выполненных экспериментов, в результате чего было получено порядка 190 индивидуальных масс-спектров, различающихся по качеству и составу масс-пиков. Затем следовал отбор соответствующих 26 используемым штаммам *Coccidioides* spp., преобразование отобранных 130 масс-спектров в общий массив, содержащий координаты всех масс-пиков всех штаммов, и отсева значений, встречающихся менее чем в половине масс-спектров обоих видов. После пост-обработки массивов всех идентифицированных масс-пиков, на следующем этапе были рассчитаны и созданы «супер-спектры» не только каждого вида (по 20 объединенных индивидуальных масс-спектров), но также и родовой «суперспектр» (40 объединенных отдельных масс-спектров). Такой тщательный поэтапный отбор данных с использованием программного обеспечения, сопровождающийся иллюстративным материалом по каждому этапу, не оставляет никаких сомнений в их достоверности, а также в том, что личный вклад автора в работу является ос-

новным. О достоверности свидетельствует также тот факт, что для оценки точности работы приборной базы и программного комплекса SARAMIS v. 3.62 соискателем был проведен анализ других широко распространенных клинически значимых микромицетов III-IV групп патогенности – *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp., референтные масс-спектры которых представлены в различных базах данных, и все они успешно идентифицировались до уровня рода, что подтвердило адекватность выбранного подхода. Сформированные референтные масс-спектры *Coccidioides* spp. были импортированы в базу данных для дальнейшего использования при их идентификации и типировании.

В **Заключении** подведены итоги работы и констатировано, что в целом полученные результаты являются достаточно убедительным подтверждением возможности использования масс-спектрометрического профилирования для оценки межштаммового сходства/различия, а выявленные особенности консервативных и переменных областей клеточных масс-спектров штаммов *Coccidioides* spp. могут также быть использованы в качестве дополнительных маркеров при молекулярной паспортизации штаммов особо опасных микромицетов. Эти утверждения вполне правомерны, однако перспективы дальнейших исследований определены недостаточно четко, в связи с чем возникают следующие вопросы:

1. Различаются ли представители видов *C.immitis* и *C.posadasii* и штаммы внутри каждого вида по степени опасности для людей или вызываемые ими заболевания имеют одинаковые клинические симптомы? Позволят ли дальнейшие исследования выявить корреляции между масс-спектром штамма и его потенциальной вирулентностью или предложенная схема типирования может служить только для эпидрасследования (определения возможного источника инфекции и путей ее распространения)?

2. Допускаете ли Вы возможность временного укоренения возбудителей кокцидиоидомикоза в случае их заносов в отдельные регионы Российской Федерации и других эндемичных стран, где в определенные периоды

могут складываться благоприятные условия для их выживания и размножения в объектах внешней среды (например, в результате природных либо техногенных катаклизмов)? Если допускаете, то может ли масс-спектрометрия служить полезным инструментом для выявления таких временных «очагов инфекции»?

3. В работе использованы все имеющиеся в распоряжении штаммы, которые, по-видимому, были выделены довольно давно, а сведения о масс-спектрах свежевыделенных отсутствуют в литературе и в базах данных. В связи с этим, выявлены ли Вами такие консервативные белки, которые сохраняют свои спектральные свойства у штаммов, изменивших другие характеристики естественным путем либо искусственным (в целях биотерроризма), и позволят идентифицировать возбудителя в случае заноса в нашу страну?

Тем не менее, все задачи исследования выполнены в полном объеме, полученные данные имеют бесспорный приоритет и перспективы внедрения в практику. Высказанные выше замечания не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации. Все научные положения и рекомендации обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.


Автореферат и научные публикации, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, отражают основное содержание работы. Автореферат оформлен в соответствии с необходимыми требованиями.

Тема и содержание диссертации соответствуют п.2 и п.3 паспорта специальности 03.02.03. – микробиология.

Заключение

Изложенное позволяет заключить, что представленная к защите диссертация **Шарова Тимура Николаевича** «Разработка алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования *Coccidioides* spp. с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований решена важная для отечественного здравоохранения научно-

практическая задача экспресс-идентификации и белкового профилирования возбудителей кокцидиомикоза. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему и методическому уровню проведенных исследований, качеству изложения и репрезентативности фактического материала работа полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК (от 24 сентября 2013 г., № 842, п.9, 10, 13), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Ведущий научный сотрудник ФКУЗ
Ростовский-на-Дону противочумный
институт Роспотребнадзора,
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник  Монахова Елена Владимировна

(ул. М.Горького, 117/40
Ростов-на-Дону 344002
Тел. (863) 240-91-33 раб.
8 960 4560864 моб.
e-mail monakhova_ev@antiplague.ru)

Подпись Монаховой Е.В.
ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный
институт Роспотребнадзора



Стоян Елена Евгеньевна