

Отзыв

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук ШАРОВА ТИМУРА НИКОЛАЕВИЧА
«РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИИ И
БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ *COCCIDIOIDES SPP.* С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ»

03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертации

Кокцидиоидомикоз – одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний микотической природы, вызываемое первичными грибными патогенами *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*. Случаи заболевания кокцидиоидомикозом имели место в Австралии, Финляндии, Новой Зеландии, Великобритании, Индии, Японии, Таиланде. Распространение этого микоза по всему миру связано, в первую очередь, с развитием туризма: большинство лиц, инфицированных микромицетами рода *Coccidioides*, заболели случайно при посещении тех стран, где микромицет присутствует в почве. Значимость проблемы кокцидиоидомикоза за последние десятилетия возросла не только для традиционно эндемичных регионов Америки, но и для стран, где заболевание ранее не регистрировалось. Проблема биотерроризма, обострение которой наблюдается в современном мире, требует по-новому взглянуть на возможность распространения кокцидиоидомикоза. Кроме этого, возбудители кокцидиоидомикоза попадают за пределы своего ареала с продуктами растениеводства.

Высокая патогенность *Coccidioides spp.* для человека, отсутствие средств специфической профилактики кокцидиоидомикоза, выраженная резистентность возбудителей ко многим химиотерапевтическим препаратам требуют пристального внимания к этим микроорганизмам, прежде всего с диагностических позиций, а также с точки зрения необходимости

установления источников инфекции, механизмов циркуляции возбудителей и этиологической расшифровки возможных вспышек заболевания, т.е. совершенствования существующих методик и разработки новых эффективных методов идентификации и типирования патогенных микромицетов.

В свете вышеизложенного заявленная цель рецензируемого исследования – «разработка алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования *Coccidioides spp.* С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии» - представляется, безусловно, актуальной.

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

Диссертационная работа Т.Н. Шарова 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, протеомных, микробиологических, 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 аprobированы характеристические масс-спектры, специфичные для рода *Coccidioides* и видов *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*, при помощи которых можно эффективно идентифицировать культуры и детектировать родовые и видовые белки гриба. Экспериментально доказано, что полученные результаты позволили рекомендовать дополнение схемы лабораторной диагностики кокцидиодомикоза этапом масс-спектрометрического анализа чистой культуры микромицетов.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендация

Материалы диссертационного исследования позволили рекомендовать использования способа времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для использования в Референс-центре по мониторингу за возбудителями глубоких микозов и в лабораториях Волгоградского НИПЧИ для анализа особенностей протеомного состава штаммов кокцидиодомикоза и микромицетов II группы патогенности.

Результаты работы Т.Н. Шарова, вошли в проекты методических указаний «Идентификация и типирование возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом MALDI-TOF MS на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности», МУ «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики возбудителей особо опасных микозов для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», методических рекомендаций МР 4.2.0089-14 "Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I - II групп патогенности"

(утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 24 апреля 2014 г.), а также при составлении ряда нормативно-методических документов учрежденческого уровня внедрения.

Созданные масс-спектры могут применяться в диагностических лабораториях учреждений Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения и других ведомств для выявления возбудителей особо опасных микозов.

Структуры и объем диссертации

Диссертация изложена на 118 листах компьютерного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка принятых сокращений, также списка использованной литературы, включающего 165 источников, в том числе 2 отечественных авторов. Текст иллюстрирован 6 таблицами и 20 рисунками. Исследования выполнены соискателем в рамках 2 тем НИР по плану Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ (КНС 48.00) и Отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011-2015 гг. Материалы исследований Т.Н. Шарова были доложены на ряде научных конференций различного уровня. По теме диссертации опубликовано 8 работ, 3 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 аprobации. Четыре положения, выносимые на защиту, отражают основные итоги исследования. Описана структуры диссертации, дана информация о публикациях.

В трех разделах первой главы (обзоре литературы) рассмотрены данные научных публикаций, касающихся разных аспектов исследуемой проблемы. Изложены сведения по таксономии и биологическим характеристикам возбудителей кокцидиоидомикоза, в том числе вирулентным свойствам. Далее обсуждаются вопросы лабораторной диагностики, включая использование MALDI масс-спектрометрии для идентификации, как культур, так и отдельных белков микромицетов.

Материал изложен кратко, но достаточно информативно, с необходимыми элементами анализа. На наш взгляд, следовало бы больше внимания уделить сведениям о масс-спектрометрическом анализе и других представителей группы возбудителей особо опасных микозов.

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление о том, что автором использованы как методы классической микробиологии (культтивирование микроорганизмов на питательных средах различного состава), так и самые современные методические подходы (масс-спектрометрическая идентификация). Возможно, следует более детально описать условия и время культивирования штаммов, как оппортунистических штаммов, так и возбудителей кокцидиоидомикоза. Работа проведена с использование 40 штаммов возбудителей микозов, двадцать пять из которых – особо опасные.

Глава 3 – «Разработка схемы пробоподготовки клеток *Coccidioides spp.* для MALDI-TOF масс-спектрометрии». В ней представлены данные об оптимизации и дополнении методик пробоподготовки культуры микромицетов, поскольку уже существующих методик, подходящих для

эффективного обеззараживания и экстракции белков возбудителей кокцидиомикоза не существует. С учетом сложности культивирования и работы грибов рода *Coccidioides*, Т.Н. Шаров успешно использовал сочетание трифторуксусной кислоты и ацетонитрила с механическим воздействием на мицелий.

В главе 4 подробно описано получение и сравнительный анализ масс-спектров возбудителей кокцидиомикоза. Далее большое внимание удалено созданию родового и видовых «суперспектров», на основе родо- и видоспецифичных белков, проверке полученных данных, и формированию подраздела базы данных SARAMIS. Установлено, что итоговые референтные масс-спектры позволяют проводить видовую идентификацию штаммов видов *Coccidioides* с приемлемой достоверностью в диапазоне 74 - 95 %. Установлено, что диапазоны масс-спектров 6000 - 10000 m/z и 4000 - 6000 m/z являются превалирующими по частоте встречаемости спектральных пиков со значениями $s/n > 30$ и характеризуются стабильным компонентным составом.

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 следует уделить, на наш взгляд, больше внимания.

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, подчеркивая её новизну и значимость для науки и практики, хотелось бы узнать о применимости масс-спектров полученных из коллекционных штаммов для работы с клиническими штаммами от больных.

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

1. Формат рисунков масс-спектров штаммов следует изменить, поскольку они меняют положение даже при небольшой правке текста.
2. Процентный показатель совпадения масс-спектров исследованных штаммов *Coccidioides* spp. с родовым суперспектром вполне можно заменить таблицей.
3. Рисунок сформированного раздела по исследуемым видам *Coccidioides* в базе данных SARAMIS необязателен, поскольку исчерпывающе описан в тексте.

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 Т.Н. Шарова «Разработка алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования *Coccidioides* spp. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии» выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-исследовательской квалификационной работой, в основу которой положен большой фактический материал по разработке перспективного направления – идентификации и белковому профилированию возбудителей особо опасных микозов с применением

времяпролетной MALDI масс-спектрометрии. 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 № 843 от 24 сентября 2013 г., как завершенная научно-квалификационная работа, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в области микробиологии, а её автор – Тимур Николаевич Шаров – заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Решетникова Ирина Дмитриевна,

Кандидат медицинских наук,

ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»

Заместитель директора по научной и лечебной работе

420015 г. Казань, ул. Б. Красная 67.

Тел.8(843)2366781; E-mail: reshira@mail.ru.

ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»



Подпись заверяю
Начальник ОК
Ирина Шарова С.Н.
Нат

