Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора)
355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д.13-15
Тел/факс: (865-2) 26-03-12
E-mail: snipchi@mail.stv.ru
ОКПО 01897080 ОГРН 1022601949930
ИНН 2636000641 КПП 263601001

28.06.2017 № 03-08-960
на №_____от_____

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук,
профессор
_____А.П. Куличенко
«_»_____ 2017 г.

[Отзыв ведущей организации на диссертацию]

Отзыв

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

Актуальность темы выполненной работы и ее связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельности

Кокцидиоидомикоз, являясь одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний микотической природы, эндемичен для многих штатов США, обнаружен в почвах Центральной и Южной Америки, случаи этого заболевания имели место в Австралии, Финляндии, Новой Зеландии, Индии, Японии, Таиланде.

Распространение этого микоза, связанное с развитием туризма, попаданием за пределы своего ареала с продуктами растениеводства указывают на реальную опасность завоза возбудителя и в Россию.

Диагностика кокцидиоидомикоза базируется на выделении чистой культуры микромицета, иммуносерологической диагностике (РНГА, РИД,

РСК, ИФА), а также на молекулярно-генетических методах, в частности, полимеразной цепной реакции. Поэтому диссертационная работа Т.Н. Шарова, посвященная совершенствованию схем диагностики и эпидемического мониторинга особо опасных микозов с применением метода времяпролетной спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), несомненно, актуальна и имеет определенную практическую значимость.

Цель исследования, связанная с разработкой алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования видов *Coccidioides* на основе сравнительного анализа MALDI-TOF масс-спектров клеточных белков, в полной мере соответствует специальности представленной диссертационной работы 03.02.03-микробиология.

Задачи исследования адекватны поставленной цели и включают ряд этапов, касающихся разработки комплекса методических приемов обработки биомассы *Coccidioides* для исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии; получения сравнительных характеристик масс-спектров коллекционных штаммов *Coccidioides*; изучения особенностей консервативных и вариабельных областей клеточных масс-спектров видов *Coccidioides* для применения в качестве дополнительных маркеров при внутривидовом типировании штаммов особо опасных микромицетов.

Задачи работы отражены в положениях, выносимых на защиту, а результаты их решения представлены в заключении и выводах.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна заключается в следующем: впервые разработан комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии биомассы штаммов особо опасных микромицетов; впервые исследована вариабельность MALDI-TOF спектров клеток штаммов *Coccidioides spp.* при различных условиях культивирования, сформированы референтные масс-спектры видов *Coccidioides* и разработан раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров SARAMIS^{TM} для идентификации и типирования изолятов *Coccidioides* с достоверностью 74-95%; впервые проведена паспортизация коллекционного фонда штаммов *Coccidioides spp.* на основе MALDI-TOF масс-спектрометрии клеточных белков.

Результаты диссертационной работы Шарова Т.Н., изложенные в научных положениях и выводах, являются достаточно обоснованными,

достоверными и доказательными, что обеспечивается современным методическим уровнем выполненной работы и большим объемом исследованного материала, адекватной статистической обработкой.

Выводы и научные положения логично вытекают из результатов исследования и являются корректными.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Диссертационная работа Шарова Т.Н. имеет весомое научно-практическое значение в связи получением новых и современных данных, касающихся совершенствования схем видовой идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза.

Материалы исследований использованы при разработке разделов МУ «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 особо опасных микозов для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», 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 24.04.2014 г.).

Кроме этого диссертант является соавтором ряда методических рекомендаций учрежденческого уровня внедрения.

Методические приемы, разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования, используются в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями глубоких микозов.

Структура и содержание работы

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитированной литературы, включающего 165 источников.

Диссертация изложена на 118 страницах компьютерного текста, иллюстрированного 22 рисунками и 6 таблицами.

Исследования выполнены в рамках двух НИР по плану координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической

охране территории РФ (КНС 48.00) и Отраслевой научно-исследовательской программе «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в РФ» на 2011-2015 гг.

Во введении представлена актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и задачи работы, её теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы проведен достаточно подробный анализ характеристики микромицетов рода *Coccidioides spp.*, современных методов идентификации, типирования и белкового профилирования возбудителей микозов. В этой главе весьма обстоятельно обсужден вопрос, касающийся применения технологии MALDI-TOF MS для идентификации биомаркеров белковой природы. Обзор литературы написан хорошим литературным языком, содержит подробную информацию по исследуемой проблеме, в обзоре приводятся последние и самые актуальные работы по данному направлению.

Анализируя раздел «Материалы и методы», следует отметить, что в нем отражены материалы, биологические объекты и разнообразные методы исследования.

Глава 3 посвящена разработке схемы пробоподготовки биомассы *Coccidioides spp.* для MALDI-TOF MS. Автором установлено, что наиболее эффективным методом, обеспечивающим как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов, является метод экстракции с использованием трифторуксусной кислоты и ацетонитрила с последующим прогреванием.

В главе 4 изложены результаты экспериментов по совершенствованию схем внутривидового типирования штаммов особо опасных микроцетов. На основе родо-, видо- и штаммоспецифических компоненетов масс-спектров консервативных клеточных протеинов 11 коллекционных штаммов *C.immitis* и 15 коллекционных штаммов *C.posadasii* сформированы родовой и видовые референтные суперспектры исследуемых микромицетов, содержащие набор наиболее характерных и стабильно воспроизводимых спектральных пиков в анализируемом диапазоне молекулярных масс.

Из полученных масс-спектров был сформирован раздел электронной базы данных SARAMIS, позволяющий проводить идентификацию и хемотипирование возбудителей кокцидиодомикоза. Автор диссертации предлагает использовать выявленные особенности консервативных и

вариабельных областей клеточных масс-спектров микромицетов в качестве дополнительных маркеров при их паспортизации и типировании.

В общем заключении на диссертацию приводятся и анализируются итоги всей работы в целом. В шести выводах автор выделяет наиболее значимые результаты и характеризует их практическое использование, что подтверждает научное и практическое значение диссертации.

Основные результаты исследования представлены на научных конференциях разного уровня и отражены в девяти опубликованных работах, из них 4 – в научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Автореферат диссертации и опубликованные статьи полностью соответствуют содержанию диссертационной работы. Основные результаты диссертации получены лично автором, что подтверждено научными публикациями, методическими указаниями и рекомендациями.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Материалы диссертации имеют практическое значение, так как разработанные базы данных референтных MALDI-TOF спектров SARAMIS позволяют проводить видовую идентификацию штаммов видов *Coccidioides immitis* и *posadasii* с необходимым уровнем достоверности, что является дополнением к схемам молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности.

Замечания к работе

Во введении (стр. 4-8) изложен материал, освещающий значимость проблемы, он излишне объемен, так как приведенные в нем данные подробно рассматриваются и обсуждаются в главе «Обзор литературы».

В «Обзоре литературы» детально представлен современный уровень исследования микромицетов за рубежом, в том числе масс-спектрометрических методов. Однако практически нет упоминаний отечественных работ по применению MALDI-TOF масс-спектрометрии для индикации и типирования микроорганизмов I-II групп патогенности, хотя таких работ достаточно много.

Так как в разделе «Собственные исследования» приводятся данные о получении и исследовании масс-спектров других возбудителей глубоких микозов – гетерогенных микромицетов и их использование для сравнения с

Coccidioides spp., то было бы желательно оформить эти данные в виде дополнительной задачи.

В разделе 4.1. рисунки 4 и 5 содержат слишком большое количество трудно воспроизводимой визуальной информации: оба рисунка занимают подряд 5 листов. По нашему мнению, этот материал можно было бы представить в виде таблицы, а в качестве примера вариабельности индивидуальных спектров штаммов можно привести 2-3 наиболее отличающихся спектра штаммов одного вида *Coccidioides* в виде иллюстраций, указав, что для другого вида наблюдается аналогичная картина.

В разделе 4.4. рисунки 16, 17, 18 было бы желательно представить в виде типичных усредненных суперспектров и провести анализ вариабельности детектируемых белков внутри вида (рода). Поскольку данная информация является логическим продолжением раздела 4.1., то, на наш взгляд, стоило бы представить эту часть работы по анализу суперспектров видов и рода *Coccidioides* в разделе 4.1., где часть этой информации уже изложена и проанализирована.

Рисунок 19 представляет собой скриншот программной оболочки БД SARAMIS v.3.62 и не несет никакой смысловой нагрузки, гораздо более информативным и интересным было бы представление и анализ видового и родового суперспектров.

Вышесказанное не влияет на общую положительную оценку представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Шарова Тимура Николаевича «Разработка алгоритмов экспресс-идентификации и белкового профилирования *Coccidioides spp.* с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03-микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной лично автором на современном научно-методическом уровне, большом экспериментальном материале

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертация и автореферат соответствуют требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ (в новой редакции от 24 сентября 2013 года № 842).

Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторной конференции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 4 от 31 мая 2017 года.

Главный научный сотрудник
научно-производственной лаборатории препаратов
для диагностики особо опасных и других инфекций
Федерального казенного учреждения
здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
доктор медицинских наук, профессор И.С. Тюменцева

Зав. лабораторией постгеномных технологий
ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора,
кандидат биологических наук Е.А. Котенева

Подписи Тюменцевой И.С. и Котеневой Е.А. заверяю:

Ученый секретарь ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора
кандидат медицинских наук Н.Г. Варфоломеева

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035
г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15. Тел/факс: (865-2)260312, E-mail: snipchi@mail.stv.ru