



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

**Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ростовский -на- Дону
ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный ин-
ститут» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека**

(ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)

344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40

Тел. (863) 240-27-03, Факс: (863) 267-02-23, E-mail: plague@aaanet.ru, Сайт:

<http://antiplague.ru>

ОКПО 01898316, ОГРН 1026103278959, ИНН 6164101841, КПП 616401001

УТВЕРЖДАЮ
Директор института

К.М.Н.

С.В. Титова

« 04 » декабря 2014г

О Т З Ы В

ведущей организации ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора о диссертации ШУНОВОЙ Александры Владимировны «Молекулярная детекция и типирование хромосомных β -лактамаз возбудителей мелиоидоза и сапа», представленной к защите на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

В последнее время в мире накоплен довольно обширный материал об индивидуальной устойчивости буркхольдерий к антибактериальным препаратам. Выраженное ингибирующее действие на клетки патогенных видов *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* в опытах *in vitro* оказывают антибактериальные препараты тетрациклинового, фторхинолонового, цефалоспоринового, карбепенемного рядов. Однако в макроорганизме-хозяине при инфицировании этой группой микроорганизмов эффект от применения перечисленных препаратов слабоэффективный или полностью отсутствует. При культивировании на селективных пита-

тельных средах, а также в процессе лечения буркхольдерии быстро приобретают резистентность к различным антибактериальным препаратам. Особенности структуры генома буркхольдерий изучены далеко недостаточно, вследствие этого способность к высокой адаптации позволяет предполагать наличие различных молекулярно-генетических механизмов, с помощью которых реализуется лекарственная резистентность, в том числе и множественная. Поэтому тема представленной к защите работы Шуновой Александры Владимировны, несомненно, актуальна.

Цель работы заключалась в конструировании олигонуклеотидных праймеров для молекулярной детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий и анализ распространённости генов β -лактамаз классов А, В и D в геномах штаммов *B.pseudomallei*, *B.mallei* и близкородственных видов.

В соответствии с целью автором поставлено 4 задачи исследования, в процессе решения которых были получены приоритетные данные, имеющие как теоретическое, так и практическое значение.

Научная новизна представленных в диссертации результатов не вызывает сомнений. Она состоит в том, что с помощью предложенного набора олигонуклеотидных праймеров для молекулярной детекции и типирования генов β -лактамаз получены новые данные о распространённости детерминант β -лактамаз молекулярных классов А, В, D в геномах штаммов *B.pseudomallei*, *B.mallei* и родственных буркхольдерий. Соискателем осуществлён подбор наиболее эффективных комбинаций праймеров для детекции последовательностей генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий в формате мультилокусной ПЦР. С помощью технологии ПЦР реального времени и плавления ампликонов высокого разрешения впервые разработан алгоритм детекции и типирования нуклеотидных полиморфизмов в генах β -лактамаз патогенных буркхольдерий.

Практическая значимость работы заключается прежде всего в том, что сконструирован набор олигонуклеотидных праймеров, которые используются для типирования, сравнительного анализа и экспресс-оценки спектра резистентности к антибиотикам β -лактамной группы коллекционных и мутантных штаммов *B.pseudomallei*, *B.mallei* в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и в работе реферес-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза. Оформлены и утверждены методические указания «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза для лабораторий территориального, регионального и федеральных уровней». На наш взгляд, эти указания представляют весьма полезный инструмент для практического здравоохранения и вполне логично их представление к утверждению на федеральном уровне.

Материалы исследований были доложены на ряде конференций различного уровня как регионального, так и всероссийского уровня, а также на конференциях с международным участием. По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них три статьи – в периодических из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утверждённых ВАК министерства образования и науки России и рекомендованных для опубликования основных результатов диссертации на соискание учёной степени.

Диссертация построена по традиционному плану, представлена на 113 листах компьютерного текста и состоит из введения, 5 глав собственных исследований, включая главу с обзором литературы по проблеме, главу с описанием материалов и методов, заключения, выводов и списка использованной литературы, содержащего 121 работу, из них 11 опубликованных в отечественных и 111 – зарубежных изданиях. Текст иллюстрирован 18 таблицами и 22 рисунками.

Во **введении** показана актуальность проблемы, убедительно подтверждённая степенью научной разработанности темы. Приведена основная информация по результатам диссертационного исследования. Пять положений, выносимых на защиту, отражают основные результаты и достижения работы.

В **обзоре литературы** (33 стр.) приведены данные об устойчивости патогенных буркхордери к антимикробным соединениям. Высказывается справедливое утверждение, что изучение геномных последовательностей *B.pseudomallei* и *B.mallei* расширит представление о вероятных механизмах его устойчивости к разнообразным антимикробным препаратам. Рассматривая заявленные отечественными и зарубежными авторами гипотезы о молекулярных механизмах формирования резистентности автор приходит к выводу, что наиболее важным механизмом формирования и реализации устойчивости к β -лактамам соединениям у возбудителей сапа и мелиоидоза является производство β -лактамаз, гены которых локализованы в хромосомах бактерий.

Большая часть использованных источников представлена публикациями последнего десятилетия. Обзор обладает достаточной информативностью, написан хорошим литературным языком, изложение данных литературы сопровождается аналитическими выводами и наблюдениями. Достоинством данной главы является то, что автор убедительно обосновала необходимость дальнейшей работы по изучению структурно-функциональных последовательностей генов β -лактамаз молекулярных классов А, В и D, что послужило необходимым переходом к главам, посвящённым собственным исследованиям.

Глава 2 (7 стр.) содержит данные о месте и времени выделения штаммов, взятых в исследование. Методики изложены кратко, но достаточно чётко, что даёт возможность легко их

воспроизвести. В целом глава позволяет составить представление о высоком методическом уровне диссертационной работы.

Собственные исследования, начало которых изложено в **главе 3** (11 стр.), посвящены описанию конструирования олигонуклеотидных праймеров для ПЦР. Выбор кодирующих последовательностей геномов буркхордерий, гомологичных известным генам β -лактамаз, был проведён на основе анализа девяти аннотированных геномов *B.pseudomallei*, *B.mallei* и близкородственного непатогенного вида *B.thailandensis* и 12 частично аннотированных геномов штаммов данных видов микроорганизмов, представленных в GenBank NCBI и базе данных геномных проектов J. Craig Venter Institute. В процессе исследования было установлено, что несмотря на принадлежность выявленных β -лактамаз классов А и D к одному суперсемейству « β -лактамазы/траспептидазы» и семейству протеинов « β -лактамазы/ D-ala корбоксипептидазы» представители каждого из классов несли в составе аминокислотной последовательности специфичный характеристический мотив активного сайта фермента. Представители металло- β -лактамаз (класс В) формировали несколько групп гомологии.

Проведённый анализ нуклеотидных последовательностей групп β -лактамаз позволил Александре Владимировне использовать их для подбора пар олигонуклеотидных праймеров. Были определены 5 групп кодирующих последовательностей β -лактамаз, относящихся к различным молекулярным классам, имеющим высокую внутригрупповую степень гомологии и отличающимися друг от друга протяжёнными участками нуклеотидных последовательностей, что дало возможность подбора дифференцирующих специфичных праймеров.

Глава 4 (9 стр.) является логическим продолжением главы 3 и посвящена исследованиям, направленным на оценку диагностической эффективности сконструированных праймеров. Александра Владимировна испытывала разработанные праймеры на образцах геномной ДНК штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, родственных видов буркхольдерий и некоторых гетерологичных микроорганизмов. Все микроорганизмы были взяты из коллекции Волгоградского противочумного института и были представлены не только дикими типами, но и штаммами с повышенным уровнем устойчивости к антибиотикам различных классов и инсерционными мутантами со сниженной антибиотикорезистентностью. В ряде экспериментов была проведена ПЦР-детекция последовательностей β -лактамаз в исследуемых образцах, которая продемонстрировала возможность дифференциации между видами буркхольдерий. Автором этот факт был использован для оценки эффективности полученных праймеров в формате мультилокусной ПЦР. Проведённые исследования подтвердили возможность дифференциации между видами буркхольдерий с помощью детекции последовательностей генов β -лактамаз классов А, В и D.

Следует отметить, что параллельно с существенной практической значимостью сконструированный набор праймеров может быть рекомендован и для выполнения фундаментальных исследований при изучении генетических полиморфизмов генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий.

Особый интерес вызывают материалы **Главы 5** (13 стр.) посвященной технологиям генотипирования, основанной на HRM-анализе специфических продуктов ПЦР, которая в настоящее время находит всё большее применение, как в исследовательских, так и в диагностических целях. В двух разделах данной главы автор приводит результаты исследования применимости анализа плавления амплифицированных ПЦР фрагментов генов β -лактамаз молекулярных классов В и D для выявления аллельного полиморфизма у штаммов различных видов буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов. Также была продемонстрирована возможность использования HRM-анализа для скрининга вероятных мутантных событий в генах β -лактамаз у штаммов *Burkholderia spp.* с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям, в том числе, препаратам β -лактаминового ряда. Отработанная технология и полученные с её помощью данные можно рассматривать как возможность расширения генетической паспортизации штаммов патогенных буркхольдерий и формирования каталогов геномных портретов изолятов *Burkholderia spp* без дополнительного использования дорогостоящего оборудования.

В **Заключении** (8 стр.) кратко, но ёмко отражены наиболее значимые, с точки зрения автора, результаты проведённых исследований. Кроме того, определены перспективы дальнейших исследований. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Сконструированный набор олигонуклеотидных праймеров может быть использован для типирования, сравнительного анализа и экспресс-оценки спектра резистентности к антибиотикам β -лактамно́й группы коллекционных и мутантных штаммов *B.pseudomallei*, *B.mallei* в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и в работе реферес-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза. А методические указания «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза для лабораторий территориального, регионального и федеральных уровней» могут быть использованы в практических лабораториях учреждений Роспотребнадзора. Полученные соискателем новые теоретические данные могут быть использованы при чтении лекций на курсах специализации по особо опасным инфекциям.

Обращает на себя внимание значительный объём проделанной работы с использованием самых современных методов исследования, наглядное представление полученных данных, краткое и корректное их обсуждение, что свидетельствует о научной зрелости соис-

кателя со сложившимся собственным стилем изложения.

Аннотация и научные публикации отражают основное содержание работы. Аннотация оформлена в соответствии с необходимыми требованиями, прекрасно иллюстрирована.

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

Принципиальных замечаний нет. Единственные замечания носят редакционный характер, например, список сокращений располагается не на традиционном месте - после оглавления, а перед списком цитируемых работ, в самом списке работ по тексту указаны 120, а в диссертации приведена 121 работа. В аннотации приведён список работ соискателя под другой фамилией. Необходимо было отметить изменения в личных данных автора. Высказанные замечания носят редакционный характер и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы, которая по актуальности поставленных задач, научной новизне, методическому уровню, объёму и завершённости экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных данных полностью соответствует требованиям к кандидатским диссертациям, изложенным в п.7 «Положения...» ВАК при Министерстве образования и науки РФ, а её автор Шунова Александра Владимировна безусловно заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Отзыв обсуждён на заседании Учёного совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 04 декабря 2014 года (протокол №12).

Зав. лабораторией

Д.М.Н., С.Н.С.

С.О. Водопьянов

Зав. лабораторией,

К.М.Н, С.Н.С.

Л.М. Веркина

Подпись Веркиной Л.М. и С.О. Водопьянова

Заверяю Начальник отдела кадров

Е.Н. Бурик