

## Отзыв

официального оппонента на диссертацию Шуновой Александры Владимировны, выполненную на тему: «Молекулярная детекция и типирование хромосомных β-лактамаз возбудителей мелиоидоза и сапа»

### Актуальность темы диссертационного исследования

Природно-очаговые зоонозы бактериальной природы по уровню регистрируемой заболеваемости занимают достаточно скромное место в структуре инфекционной патологии человека. Вместе с тем, при оценке реальной социальной и медицинской значимости этой группы инфекций следует принимать во внимание и многие другие факторы, помимо данных официальной статистики.

Расширение международных связей создаёт условия для распространения патогенных буркхольдерий из эндемичных очагов. Литературные данные свидетельствуют о том, что нозоареалмелиоидоза неуклонно расширяется, охватывая новые территории. Наряду с другими возбудителями особо опасных инфекций *B. mallei* и *B. pseudomallei* рассматриваются как потенциальные агенты биотerrorизма.

β-лактамные антибиотики остаются наиболее часто назначаемыми антибактериальными лекарственными препаратами в странах Европы, в том числе и в Российской Федерации. В 2001 году ВОЗ приняла глобальную стратегию по сдерживанию распространения устойчивых к противомикробным препаратам бактерий. Для понимания процессов формирования антибиотикорезистентности необходимы знания о механизмах устойчивости на молекулярном уровне. Совершенствование технологии экспресс-оценки наличия детерминант антибиотикорезистентности изолята имеет важное практическое значение для назначения адекватной антибиотикотерапии.

В этой связи тема диссертационного исследования Шуновой А.В. является актуальной.

### Степень научной обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссидентом использованы различные микробиологические и молекулярно-генетические методы исследования. Работа выполнена на 25 коллекционных штаммах различных видов патогенных буркхольдерий.

Все применённые методики современны, высокоинформативны и адекватны поставленным задачам, их использование обусловлено логикой эксперимента, целью и задачей того или иного этапа исследования. Экспериментальные данные статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Всё выше изложенное свидетельствует о том, что научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в работе, достаточно обоснованы и весьма убедительны.

### Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

На первом этапе работы автор провела выбор кодирующих последовательностей геномов *Burkholderia*, гомологичных известным генам β-лактамаз, проведён автором на основе девяти аннотированных геномов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*, а также 12 частично аннотированных геномов штаммов данных видов бактерий. Выделено 118 хромосомных локусов буркхольдерий, содержащих кодирующие последовательности, гомологичные известным генам бактериальных β-лактамаз. Было установлено девять групп гомологии, включающих ферменты различных суперсемейств, принадлежащих к β-лактамазам молекулярных классов А, В и D.

Экспериментальная оценка эффективности сконструированных праймеров для детекции генов β-лактамаз, проведённая с использованием ПЦР на штаммах патогенных буркхольдерий показала, что все использованные штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* содержали последовательности, характерные для β-лактамаз различных классов. Показана также возможность дифференциации видов буркхольдерий по наличию генов металло-β-лактамаз и оксациллиназ. Это положение было подтверждено результатами постановки мультилокусной ПЦР по набору генов β-лактамаз классов В и D.

В дальнейшей работе автором была исследована возможность использования сконструированных праймеров для детекции штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к цефталидину.

Автор, используя технологию плавления ампликонов с высоким разрешением, провела определение генетического полиморфизма генов β-лактамаз патогенных буркхольдерий. Показано наличие трёх аллельных вариантов гена β-лактамазы класса В и двух – класса D в исследуемых штаммах.

## Структура диссертации и оценка содержания работы в целом

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 113 листах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, содержащих обзор литературы по проблеме, методической части и экспериментальных разделов, заключения, выводов и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 22 рисунками. Библиография содержит ссылки на 121 публикацию (11 отечественных и 110 зарубежных).

Обзор литературы достаточно полный и отражает современное состояние вопроса.

Выводы логично завершают представленный труд, достаточно информативно. Материалы диссертации в достаточной мере представлены в 11 научных печатных работах, в том числе материалах шести конференций с международным участием и в трёх изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утверждённых ВАК РФ. Диссертация имеет практическое значение. Материалы исследований вошли в проект методических указаний «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», которые планируются к утверждению на федеральном уровне. Сконструированные диссидентом праймеры применяются лабораториями ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт и референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза для типирования коллекционных и мутантных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а также определения их резистентности к β-лактамным антибиотикам.

По результатам работы получены патенты на изобретения «Инсерционный мутант *Burkholderia pseudomallei* КМ31 – модельный штамм для молекулярно-генетического анализа механизмов формирования множественной антибиотикорезистентности у патогенных буркхольдерий» № 2413763 от 10.03.2011 г. и «Олигонуклеотидные праймеры для детекции и типирования генов β-лактамаз патогенных буркхольдерий» № 2474614 от 10.02.2013 г.

Материалы диссертационной работы используются при чтении лекций и проведении практических занятий в отделе подготовки специалистов по особо опасным инфекциям ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт и на медико-биологическом факультете Волгоградского государственного медицинского университета.

Положительно оценивая работу Шуновой А.В. в целом, не могу не высказать ряд замечаний:

- плазмиды не относятся к мобильным генетическим элементам бактерий;
- в таблице 3 приведена характеристика используемых в работе штаммов буркхольдерий (номер штамма, место и год выделения), но нет характеристики их антибиотикограмм. В то же время, одной из предпосылок проведения данной работы Вы называете «высокую природную устойчивость данных бактерий ко многим антибактериальным препаратам»;
- из данных, приведённых в главе 1.2 литературного обзора, касающейся «устойчивости патогенных буркхольдерий к antimикробным соединениям» невозможно составить представление ни об уровне резистентности, ни о спектре антибиотикоустойчивости. Приведена ссылка всего на 4 работы, и по данным Ashdown, *Burkholderia pseudomallei* проявляют чувствительность практически ко всем β-лактамам, взятым в исследование;
- Вы пишите, что «патогенные буркхольдерии обладают высокой природной устойчивостью к широкому спектру antimикробных соединений». Природной устойчивости к разным группам антибиотиков не бывает, т.к. каждая группа антибактериальных препаратов характеризуется определённым механизмом действия на микробную клетку и биохимические механизмы резистентности различны;
- описание генов, кодирующих синтез β-лактамаз, необходимо было дополнить фенотипической характеристикой экспрессируемого признака;
- Ваша работа называется «Молекулярная детекция и типирование хромосомных β-лактамаз возбудителей мелиоидоза и сапа», а раздел 4.3 посвящён «молекулярно-генетическому анализу штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антибиотикам» и анализируются штаммы с экспериментально полученной устойчивостью к офлоксации, пефлоксации. Эти препараты относятся к фторхинолонам, а не к антибиотикам.

Хотелось бы услышать разъяснение автора по следующим вопросам:

- как Вы получали инсерционные мутанты (таблица 10) и производные штаммы буркхольдерий, резистентные к химиотерапевтическим препаратам (таблица 9). В главе «Материалы и методы» нет описания методик или ссылок на источники.
- почему из многочисленных цефалоспориновых антибиотиков Вами выбран цефтазидим, когда есть уже цефалоспорины IV и V поколений.

## Заключение

•  
Диссертационная работа Шуновой Александры Владимировны, выполненная на тему: «Молекулярная детекция и типирование хромосомных

β-лактамаз возбудителей мелиоидоза и сапа» является самостоятельной законченной научной работой, в которой, на основании выполненных автором исследований, сформулированы и обоснованы научные положения, касающиеся сравнительной характеристики нуклеотидных последовательностей генов хромосомных β-лактамаз патогенных буркхольдерий, предложен набор праймеров для молекулярной детекции генов β-лактамаз различных молекулярных классов у *B. pseudomallei* *B. mallei*, получены новые данные о распространённости детерминант β-лактамаз молекулярных классов A, B, D в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и родственных буркхольдерий, осуществлён подбор наиболее эффективных комбинаций праймеров для детекции последовательностей генов β-лактамаз патогенных буркхольдерий в формате мультилокусной ПЦР, разработан алгоритм детекции и типирования нуклеотидных полиморфизмов в генах β-лактамаз патогенных буркхольдерий с использованием технологии ПЦР в режиме реального времени и плавления ампликонов высокого разрешения (high resolution melting, HRM).

Считаю, что по актуальности решённой задачи, научно-методическому уровню выполнения, научной новизне и практической значимости полученных результатов рецензируемая работа полностью отвечает требованиям п. 9 и п. 13 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Профессор кафедры микробиологии,  
вирусологии и иммунологии  
ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский  
университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России  
д.м.н., профессор

Швиденко И.Г.

*Швиденко*

ПОДПИСИ  
ЗА ВЕР  
НАЧАЛЬНИК



Швиденко Инна Григорьевна

410002, г.Саратов, ул. Набережная Космонавтов, д.1, кв.61  
т. 23-83-60

e-mail: [innashvidenko@mail.ru](mailto:innashvidenko@mail.ru)

ГБОУ ВПО «СГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России