

Отзыв официального оппонента на диссертацию
Шуновой Александры Владимировны «Молекулярная детекция и
типирование хромосомных (3-лактамаз возбудителей мелиоидоза и сапа», на
соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 - микробиология

Актуальность исследования. *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*, - патогенные бактерии, вызывающие инфекционные заболевания - сап и мелиоидоз. В Российской Федерации отсутствуют эндемичные по этим инфекциям районы, однако, вероятность завозных случаев и потенциальная опасность использования этих микроорганизмов в качестве агентов биотерроризма обуславливают интерес к изучению биологии этих патогенов. Представители разных видов рода буркхольдерий обладают природной устойчивостью к антибактериальным препаратам. Естественным следствием этого феномена являются трудности, возникающие при лечении инфекций, этиологическими агентами которых являются патогенные буркхольдерий. Несмотря на усилия исследователей молекулярные механизмы (поли)резистентности у большинства видов *Burkholderia*, по-прежнему, остаются мало выясненными. К числу препаратов, используемых для терапии сапа и мелиоидоза, относятся антибиотики (β -лактаминового ряда). При помощи биоинформационного анализа в геномах патогенных буркхольдерий идентифицированы последовательности β -лактамаз, - ферментов, разрушающих молекулы этих антибиотиков. Изучение структуры и распространенности генетических детерминант синтеза инактивирующих энзимов необходимо для разработки рациональных схем антибиотикотерапии сапа и мелиоидоза, а также для совершенствования алгоритмов генодиагностики и молекулярно-эпидемиологического мониторинга полирезистентных штаммов,

вызывающих эти инфекции. Все изложенное свидетельствует об актуальности рецензируемого исследования.

Цель работы заключалась в «конструировании олигонуклеотидных праймеров для молекулярной детекции и типирования генов (β -лактамаз патогенных буркхольдерий и анализе распространенности генов (β -лактамаз) трех классов в геномах штаммов этих видов. Вполне весомая (для диссертации кандидатского ранга) цель, заметим, однако, что «конструирование праймеров...» не может являться ни целью, ни даже ее составной частью, а лишь средством ее достижения. Поэтому, корректнее было бы: «Молекулярная детекция и типирование... при помощи сконструированных... праймеров» и далее - по тексту. В соответствии с целью исследования было определено 4 задачи по выяснению разных сторон исследуемого вопроса. К формулировке задач нет принципиальных замечаний, однако, все-таки использовать аббревиатуры (задачи 1,4) не принято, как и англоязычную терминологию (задача 4).

Автором проведен значительный объем экспериментов, в итоге которых, последовательно решая перечисленные задачи, А.В.Шунова достигла поставленной цели.

Научная новизна представленных в диссертации результатов несомненна. Она состоит в том, что с применением биоинформационного методического подхода получена сравнительная характеристика: во 1-х нуклеотидных последовательностей хромосомных генетических детерминант синтеза β -лактамаз патогенных буркхольдерий и, во 2-х - дедуцированных белковых продуктов. Автором сконструирован набор из пяти пар праймеров, с помощью которого возможна дифференцированная детекция генов этих ферментов относящихся к различным молекулярным классам у возбудителей сапа и мелиоидоза. В результате тестирования большой выборки буркхольдерий и представителей других таксономических групп

бактерий, определены параметры распространенности генов β - лактамаз молекулярных классов А, В, D в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и родственных буркхольдерий.

На основе технологии ПНР в режиме реального времени и метода плавления ДНК-ампликонов высокого разрешения разработан алгоритм детекции и типирования полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов Р-лактамаз патогенных буркхольдерий. Приоритетность полученных данных подтверждается получением двух патентов РФ на изобретения (одного – на модельный штамм, второго - на одигонуклеотидные праймеры).

Практическая значимость работы заключается, прежде всего, в том, что набор олигонуклеотидных праймеров, сконструированных диссертантом, используется в идентификационной деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза, а также в плановой экспериментальной работе подразделений Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Материалы исследований вошли в состав проекта методических указаний «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», подготовленных к утверждению на федеральном уровне, что определяет потенциально широкий спектр учреждений здравоохранения и других ведомств, в которых могут быть использованы сведения и препараты, полученные автором.

Структура и объем диссертации. Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 113 страницах машинописного текста; состоит из введения, одной главы, в которой изложен обзор литературы, 4 глав собственных исследований, включая главу с описанием материалов и методов, заключения, выводов и списка литературы. Он содержит 121 работу (а не 120, как указано в тексте диссертации!) Текст иллюстрирован 18

таблицами и 22 рисунками. Кроме того имеется список сокращений и условных обозначений (на одной странице, после «Выводов»). Материалы исследований были доложены на ряде конференций различного уровня. По теме диссертации опубликовано 11 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. Исследования выполнены в рамках плановой научной тематики Волгоградского НИПЧИ.

Во **введении** излагается актуальность выбранного направления - скороговоркой, на одном листе, очевидно, считая ее (актуальность), «очевидной». Приведена также основная информация по результатам диссертационного исследования, их новизна и практическая значимость. Пять положений, выносимых на защиту, отражают основные результаты и достижения работы. Описаны этапы апробации и структура диссертации.

В объемном (38 страниц) **обзоре литературы** приведены данные научных публикаций, касающиеся разных аспектов исследуемой проблемы и проведен их подробный анализ. Изложена информация об основных биологических свойствах возбудителей сапа и мелиоидоза, в том числе - сведения о геномах этих патогенов. Охарактеризована устойчивость патогенных буркхольдерий к антимикробным препаратам. Очень подробно обсужден материал относящийся к механизмам резистентности бактерий к (3-лактамным антибиотикам. Далее освещены проблемы современной классификации бактериальных β -лактамаз, особенности структуры и функции представителей различных групп этих ферментов. Отдельный раздел 1.5 «Обзора» посвящен β -лактамазам патогенных буркхольдерий; он представляется нам редуцированным и малоинформативным.

Приводимые диссертантом сведения важны и уместны, поскольку сап и мелиоидоз являются экзотическими инфекциями и особенности их биологии, в том числе, генетические и биохимические широко не известны даже специалистам. На стр. 24 диссертант делает спорное утверждение: «не вызывает сомнений, что внедрение в медицинскую практику антибактериальных препаратов *коренным образом изменило* биологию микроорганизмов». Но: базовые биологические свойства, характеризующие род, вид, штамм не меняются в зависимости от наличия/отсутствия резистентности к антибиотикам.

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление о том, что автором использованы преимущественно современные методические подходы - биоинформационный, ПЦР, анализ кривых плавления ДНК-фрагментов, олигонуклеотидный синтез. Однако и методы традиционной микробиологии (определение антибиотикограмм, выделение ДНК, электрофорез) были активно «привлечены» для проведения опытов. Надо отметить, что некоторые методы изложены излишне подробно, например, хорошо известный способ определения чувствительности к антимикробным препаратам при помощи дисков. С другой стороны, не приведено название (дан только номер) МУК, согласно которым оценивали результаты тестов. Слишком кратко описан метод HRM- анализа и, поэтому, при чтении главы 5, в которой изложены результаты проделанных экспериментов, понимание авторской интерпретации этих данных (то есть, логики рассуждений) затруднительно (в частности, как делается вывод о мономорфности/полиморфности гена). Объектами исследования служил большой набор микроорганизмов, не только буркхольдерий, но и представителей других таксонов. Активно анализировались международные базы данных нуклеотидных последовательностей.

В главе 3 «Конструирование олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-детекции последовательностей генов β -лактамаз патогенных буркольдерий» приведены данные экспериментов *in silico*, то есть, с помощью нового высокоинформативного методологического подхода, использующего сложное компьютерное обеспечение и требующего серьезной аналитической подготовки экспериментатора для корректной интерпретации. В результате проведенного анализа аминокислотные последовательности β -лактамаз буркольдерий были распределены по критерию гомологии на девять групп, включающих ферменты, относящиеся к двум белковым (супер) семействам. Для подбора олигонуклеотидных праймеров, пригодных для «генной» детекции, были определены пять групп кодирующих последовательностей β -лактамаз, относящихся к различным молекулярным классам, имеющих высокую внутригрупповую степень гомологии. Итогом этого этапа исследования явилась разработка пяти пар праймеров, комплементарных участкам генов β -лактамаз буркольдерий классов А, В, D.

Глава 4 «Анализ распространенности β -лактамаз классов А, В и D в геномах патогенных буркольдерий». Во-первых, определена эффективность использования сконструированного набора олигонуклеотидов, выявляющих генетические последовательности, кодирующие β -лактамазы, в формате мультилокусной ПЦР, для детекции и дифференциации штаммов патогенных буркольдерий группы «*pseudomallei*». Кроме того, эксперименты показали, что сконструированный Александрой Владимировной набор олигонуклеотидов пригоден также для молекулярно-генетического анализа Tn-индуцированных дериватов штаммов буркольдерий со сниженной чувствительностью к антибиотикам, и - мутантных штаммов с повышенным уровнем антибиотикорезистентности. Многочисленные рисунки и таблицы не дают основания сомневаться в сделанных заключениях, однако, возникает закономерный вопрос - *насколько обосновано было в принципе ожидать, что праймеры не будут детектировать*

специфические нуклеотидные последовательности в геномах штаммов с повышенной/ пониженной резистентностью?

Глава 5, объемом 14 страниц, богато иллюстрированная, посвящена результатам экспериментов по использованию метода плавления специфических ПЦР-ампликонов с высоким разрешением для анализа полиморфизма генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий. При этом, как и на предыдущем этапе, тестировались геномы не только «диких» коллекционных штаммов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» и гетерологичных микроорганизмов, но и мутантных производных штаммов буркхольдерий с измененной чувствительностью к антибиотикам. По своей сути примененный метод несложен и эффективен, чувствителен и специфичен, то есть потенциально применим для генотипирования и выявления мутационных изменений. При этом, интерпретация формы полученных кривых плавления ДНК-ампликонов, на основании которой делаются выводы, требует наличия специального пакета программ. Вполне убедительно доказано, что данный подход адекватен решению поставленной диссертантом задачи. Хотя, на наш взгляд, выражение «кандидатные мутантные последовательности гена...» (стр. 86) некорректно.

В **Заключении** кратко подведены итоги работы, но перспективам дальнейших исследований уделено недостаточное внимание. Предполагаемая «технологизация..., создание тест-системы..., государственная регистрация» - все это важно, но относится уже не к области научных разработок, а практического внедрения. Поэтому этот вопрос - что же дальше перспективно по выбранному *научному* направлению - адресуется соискателю. На наш взгляд, одной из ближайших конкретных перспектив является расширение выборки тестируемых штаммов, возможно, в *совместных исследованиях* включив в ее состав штаммы возбудителей сапа и мелиоидоза, хранящиеся в коллекциях других учреждений (Минздрава, Минсельхоза и других).

Пять выводов диссертации основываются на представленном экспериментальном материале и логически завершают проделанную работу. Заметим, что вывод 5 («исследована возможность...») сформулирован некорректно, поскольку констатирует лишь то обстоятельство, что изучалась применимость метода, но не информирует о полученных данных и выявленных закономерностях.

Большой объем проведенных исследований, их методический уровень, грамотная интерпретация и анализ результатов не оставляют никаких сомнений в их достоверности. Большим достоинством работы является краткость изложения, сочетающаяся с высокой информативностью.

Естественно, работа не лишена недостатков, исключительно, редакционно-стилистического плана.

1. На электрофореграммах продуктов амплификации (рис. 3-9) нет обозначений размеров фрагментов, ни амплифицированных, ни маркерных. Поэтому, в некоторых случаях имеются затруднения в восприятии информации, например, рис. 7, иллюстрирующем наличие ампликона 190 н.п. в геномах буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов: мажорная полоса находится на разных уровнях; кроме того, отчетливо видны дополнительные зоны, очевидно, образованные продуктами неспецифической амплификации вследствие плохо подобранных условий прохождения реакции).
2. Некорректные словосочетания - «адаптация (?) их геномов» (стр. 4), «сгенерирован набор праймеров» (стр. 8), «у видов отдаленной гетерологии...» (стр. 70 и 95) и т.п.
3. Стр. 45: «мутационные изменения могут происходить естественным путем» - а как иначе - в природных условиях?
4. Стр. 72 - «постановка мультилокусной ПЦР на широком наборе штаммов... (рис. 9)»; но в подписи к рисунку поименованы всего то 14

штаммов: 9 - *B.ceracia*, два - *B.pseudomallei*, и по одному - *B. mallei*, *B. thailandensis*, *V.cholerae*.

Некоторые аспекты остаются непонятными, поэтому возникают вопросы к диссертанту:

1. Как можно объяснить снижение антибиотикоустойчивости сапного микроба по сравнению с мелиоидозным и *B. thailandensis* (стр. 19), учитывая вероятные направления эволюции микроорганизмов?
2. Геномное «сканирование» (стр. 5) - ?
3. Каков механизм устойчивости клебсиелл у пенициллину вследствие изменения мишени (стр. 22) - ведь у этого вида бактерий имеется полноценная клеточная стенка?

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации. Научные положения, выводы и рекомендации обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Автореферат и научные публикации отражают основное содержание работы.

Все изложенное позволяет заключить, что диссертация А.В.Шуновой выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-исследовательской квалификационной работой, в основу которой положен большой фактический материал по разработке перспективного направления - использованию молекулярных маркеров (особенностей структуры генов β - лактамаз) для мониторинга патогенных буркхольдерий.

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 № 842 от 24 сентября 2013 г., как завершенная научно-квалификационная работа, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в области микробиологии, а её автор - Александра Владимировна Шунова - заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Ю.А. Попов

Попов Юрий Алексеевич,
доктор биологических наук, профессор
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт "Микроб»,
отдел образовательных программ
и подготовки специалистов, заведующий отделом
410005 Г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел. 845-2-51-52-30; E-mail – rusrap1@microbe.ru

Подпись заведующего отделом, профессора Ю.А. Попова

Заверяю

Начальник отдела кадров
Российского научно-исследовательского
противочумного института "Микроб"



К.В. Бычков