

**ОТЗЫВ**  
**на автореферат диссертации Шуновой Александры Владимировны**  
**«Молекулярная детекция и типирование хромосомных β-лактамаз возбудителей**  
**мелиоидоза и сапа», представленной на соискание ученой степени кандидата**  
**медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология**

В последние годы серьезную проблему в медицинской микробиологии представляет формирование устойчивости бактерий к лекарственным препаратам, что приводит к снижению эффективности этиотропной терапии инфекционных болезней. Для природных штаммов патогенных буркхольдерий характерна высокая устойчивость к антибактериальным препаратам. На сегодняшний день данных о механизмах формирования такой резистентности у возбудителей сапа и мелиоидоза не достаточно. Особый интерес представляет оценка распространенности β-лактамаз расширенного спектра в штаммах буркхольдерий, поскольку несмотря на чувствительность в условиях *in vitro* этих патогенов к антибиотикам пенициллинового и цефалоспоринового ряда, при персистенции их в макроорганизме данные препараты оказываются малоэффективными. Изучение генетических маркеров устойчивости к β-лактамным соединениям также может способствовать совершенствованию схем лечения сапа и мелиоидоза, разработке систем молекулярного типирования *B. mallei* и *B. pseudomallei*. В связи с этим, диссертационная работа Шуновой А.В., направленная на выявление и изучение хромосомных β-лактамаз возбудителей мелиоидоза и сапа, несомненно, актуальна.

Для достижения поставленной цели Александра Владимировна решает задачи по следующим направлениям:

- провести сравнительный анализ генов β-лактамаз патогенных буркхольдерий *in silico* и подобрать набор олигонуклеотидных праймеров для их детекции методом ПЦР,
- изучить распространность генов β-лактамаз молекулярных классов A, B и D в геномах коллекционных штаммов возбудителей сапа, мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий,
- оптимизировать условия детекции и типирования генов хромосомных β-лактамаз патогенных буркхольдерий с помощью мультилокусной ПЦР ,
- разработать алгоритм определения полиморфизма единичных нуклеотидов в генах β-лактамаз возбудителей сапа и мелиоидоза по анализу плавления ампликонов высокого разрешения методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

На основании анализа полных и частично аннотированных геномов возбудителей сапа, мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий, представленных в базе данных GenBank NCBI, *in silico* автором определено наличие у патогенов аминокислотных последовательностей, принадлежащих к β-лактамазам трех молекулярных классов A, B, D.

С целью изучения распространенности этих ферментов у коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий были подобраны праймеры, flankирующие фрагменты генов *BMA10247\_A1040* (класс A) размером 680 п.н., *BMA\_A0168* (класс B) – 352 п.н., *BURPS1106B\_2313* (класс B) – 727 п.н., *BURPS1106B\_A3704* (класс B) – 190 п.н., *BURPS1106B\_2455* (класс D) – 440 п.н., и оптимизированы условия их амплификации. При выборе праймеров учитывалась возможность амплификации их в одной реакционной смеси. Установлено, что локусы, отвечающие за синтез β-лактамаз класса A, выявлены у

всех представителей буркхольдерий,  $\beta$ -лактамаз класса В – либо только у видов буркхольдерий (*BMA\_A0168*), либо у *B. mallei* и *B. pseudomallei* (*BURPS1106B\_2313*), либо у разных видов патогенов (*BURPS1106B\_A3704*),  $\beta$ -лактамаз класса D – только у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*. Полученные результаты позволили автору разработать мультилокусную ПЦР для дифференцирования видов буркхольдерий на основании выявления генов  $\beta$ -лактамаз классов В и D, и оценить её эффективность при исследовании коллекционных штаммов микроорганизмов, в том числе с измененной чувствительностью к препарата姆 пенициллинового и цефалоспоринового ряда.

На следующем этапе своей работы Александра Владимировна оценила вариабельность амплифицируемых фрагментов указанных генов у штаммов разных видов буркхольдерий с помощью анализа температуры плавления ампликонов с высоким разрешением. Локус *BMA\_A0168*, кодирующий синтез  $\beta$ -лактамазы класса В, представлен тремя аллелями, при этом штаммы *B. thailandensis* имеют отдельный профиль по данному гену. Ген *BURPS1106B\_2313*, также участвующий в синтез  $\beta$ -лактамаз этого класса, в свою очередь оказался полностью гомологичным у всех изученных изолятов, вне зависимости от их видовой принадлежности. Не отличался вариабельностью и фрагмент гена *BURPS1106B\_2455*, определяющего продукцию  $\beta$ -лактамазы класса D: всего 2 аллели, одна из которых встречается только у представителей *B. thailandensis*. Наибольшее количество изменений выявлено в нуклеотидной последовательности локуса *BURPS1106B\_A3704*, кодирующего синтез  $\beta$ -лактамазы класса В. Данный ген представлен 7 аллелями, при этом штаммы *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *B. mallei*, *B. cereus*, а также ряд культур *B. pseudomallei* имели уникальный молекулярный профиль по данному гену. Все это указывает на перспективность использования предложенного автором подхода по определению полиморфизма единичных нуклеотидов в генах, отвечающих за синтез  $\beta$ -лактамаз классов В и D, для молекулярного типирования штаммов патогенных буркхольдерий и необходимость продолжения таких исследований с целью выяснения стабильности таких изменений.

Автор продемонстрировал возможность применения разработанного алгоритма для скрининга вероятных мутаций в последовательностях выбранных генов у штаммов *Burkholderia* spp. с измененной чувствительностью к антимикробным соединениям.

Выводы сделанные автором обоснованы, не вызывают сомнения и соответствуют цели и поставленным задачам. Положения, выносимые на защиту, отражают результаты проведенных исследований. Основное содержание диссертации отражено в 11 опубликованных работах, три из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Получено два патента на изобретения. Материалы работы нашли применение при разработке методических указаний по порядку организации и проведения лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней, а также при проведении исследований в референс-центре по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

Таким образом, диссертационная работа Шуновой А.В. «Молекулярная детекция и типирование хромосомных  $\beta$ -лактамаз возбудителей мелиоидоза и сапа» посвящена актуальной проблеме, выполнена на большом материале с использованием современных молекулярно-генетических технологий, полученные результаты имеют новизну, теоретическую, практическую значимость, могут быть использованы для расширенной генетической паспортизации и быстрой оценки спектра резистентности к антибиотикам  $\beta$ -лактамной группы штаммов патогенных буркхольдерий. Диссертационная работа

соответствует критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» пп. 9,10,11 и 13, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации N 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор Шунова Александра Владимировна заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующая лабораторией  
молекулярной диагностики  
Федерального казенного учреждения  
здравоохранения Российский  
научно-исследовательский  
противочумный институт «Микроб»  
Федеральной службы по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
кандидат биологических наук

Н.А. Осина

410005, г. Саратов,  
ул. Университетская, 46  
Тел. 8(8452) 51-52-11, 89198278822  
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Подпись Н.А. Осиной ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров  
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»  
Роспотребнадзора



К.В. Бычков