



Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Титовой Татьяны Николаевны «Разработка и оценка информативности нового способа детекции *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Важность разработки новых эффективных методов лабораторной диагностики дерматомикозов, вызванных зоофильными грибами рода *Microsporum* и *Trichophyton*, несомненна. Среди этих методов в последующие годы особое внимание уделяется конструированию тест-систем, основанных на достижениях молекулярной генетики.

Поэтому цель исследования Т.Н. Титовой, связанная с созданием видоспецифических ПЦР-систем для идентификации патогенных грибов *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, безусловно, актуальна.

Диссертация построена по традиционной схеме, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений с характеристикой штаммов *Microsporum spp.* и *Trichophyton spp.*, использованных в работе. Работа изложена на 159 страницах текста, иллюстрирована 5 таблицами и 23 рисунками. Библиографический указатель включает 215 отечественных и зарубежных публикаций.

Во введении обосновывается актуальность и степень разработанности темы исследования, цели и задачи работы, ее научная новизна, теоретическая и практическая значимость, приводятся положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы представлены материалы, свидетельствующие о клинической значимости дерматомикозов, в том числе вызываемых зоофильными грибами родов *Microsporum* и *Trichophyton*. Обращено внимание на важность установления источника заражения людей

зооантропонозными микозами, кратко описана клиническая характеристика заболеваний микроспорией и трихофитией, особенности их возбудителей. Более подробно изложены регламентированные методы лабораторной диагностики дерматомикозов, указаны их положительные стороны и недостатки. Наиболее значительное место в обзоре литературы занимает раздел, связанный с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации дерматомицетов. Несомненно, он имеет самое прямое отношение к теме диссертации. Однако, на наш взгляд, описание общих методических приемов и вариантов ПЦР занимает излишне много места в обзоре, тогда как анализ публикаций о результатах применения ПЦР для детекции возбудителей дерматомикозов изложен слишком сжато. Тем не менее, автор справедливо отмечает, что создание тест-систем на основе ПЦР для идентификации возбудителей как антропонозных, так и зоонозных дерматомикозов является актуальной задачей.

В главе «Материалы и методы исследования» диссертант приводит данные об объеме проведенных исследований, включающих 269 образцов клинического материала от пациентов с диагнозом микроспория и 427 – с диагнозом трихофития. Кроме того были исследованы образцы 189 пациентов с другими кожными заболеваниями. Подробно изложены методы исследования клинического материала, включающие световую микроскопию, культивирование и идентификацию грибов. Описаны способы выделения ДНК из клинического материала, необходимые для последующего применения в ПЦР. Приводится краткое описание метода автоматического секвенирования ДНК, использованного для подтверждения специфичности амплифицированных продуктов ПЦР. Важными для работы явились методические приемы, связанные с компьютерным анализом нуклеотидных последовательностей из базы данных GenBank и статистической обработкой полученных данных. Следует обратить внимание на то, что диссертантом использованы расчеты, позволяющие с высокой степенью достоверности судить об эффективности разработанных методов диагностики.

В то же время упомянутые в этом разделе этапы работы, связанные с методами выделения ДНК, подбором олигонуклеотидных праймеров для ПЦР и последующим электрофоретическим анализом ДНК, по-видимому, более целесообразно было бы включить в главы собственных исследований.

В главе 3 автор приводит сравнительный анализ регламентированных методов лабораторной диагностики изучаемых дерматомикозов. Отмечено, что результаты световой микроскопии клинического материала не позволили установить надежные критерии для дифференциации дерматомицетов. При культуральном исследовании был получен 601 штамм, из которых 244 отнесены к *M. canis*, 168 – к виду *T. mentagrophytes*, 189 – к виду *T. verrucosum*. Тем не менее, при микроскопии клинического материала не удалось идентифицировать дерматомицеты до вида, а при микологическом исследовании ряда образцов выявлены культуры, обладающие нехарактерными фенотипическими признаками. Для последующих исследований диссертантом была собрана коллекция штаммов *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* с типичными и атипичными для каждого вида морфологическими признаками.

В очень небольшой по объему главе 4 диссертантом обосновывается выбор наиболее эффективного метода выделения ДНК из клинического материала с помощью нуклеосорбции. Как уже отмечалось, материалы этой главы следует рассматривать вместе с данными, представленными в главе «Материалы и методы».

Наиболее существенные результаты диссертационной работы представлены в главе 5, посвященной конструированию тест-систем для ПЦР-детекции возбудителей микроспории и трихофитии в клиническом материале. На первом этапе автором была решена задача по выбору праймеров для ПЦР, используя переменные участки консервативных генов, а именно транскрибируемые спейсеры ITS 1 и ITS 2, фланкирующие ген 5, 8 рРНК. Для идентификации *T. mentagrophytes* были подобраны праймеры TriM130F/TriM311R, *T. verrucosum* – Ver76F/Ver366R, *M. canis* –

Mic480F/Mic660R. При апробации на музейных культурах трех видов выявлены амплификации видоспецифических фрагментов ДНК заданных размеров, тогда как с дерматомицетами других видов получены отрицательные результаты. Диссертант подробно описывает этапы и подбор оптимальных условий для эффективной амплификации специфических участков ДНК при идентификации *M. canis*, *T. mentagrophytes* и *T. verrucosum*. Автором было проведено секвенирование амплифицированных специфических участков ДНК. Анализ секвенированных последовательностей с помощью программы Megablast показал, что они совпадают с последовательностями, зарегистрированными в GenBank, что подтверждает специфичность выбранных праймеров. Чувствительность ПЦР-систем в отношении ДНК *M. canis* составила 34 пкг/мкл, *T. mentagrophytes* – 21,4 пкг/мкл, *T. verrucosum* – 45,3 пкг/мкл.

При оценке клинических образцов ДНК *M. canis* выявлена в 97 %, *T. mentagrophytes* – в 97,4 %, *T. verrucosum* – в 97,9 %. Результаты микроскопического и культурального исследования образцов уступали по чувствительности ПЦР. Кроме того положительные результаты ПЦР были получены с образцами, из которых были выделены атипичные культуры, что подтверждает более высокую специфичность ПЦР по сравнению с регламентированными методами.

В главе 6 приводятся данные по обоснованию выбора адекватных групп сравнения для оценки информативности используемых методов. При этом была проанализирована эпидемиологическая ситуация по дерматомикозам в Республике Башкортостан с 1996 г. по 2013 г., что позволило отобрать соответствующие группы обследованных больных с подозрением на микроспорию и трихофитию.

Результаты сравнительной оценки информативности ПЦР и регламентированных методов лабораторной диагностики дерматомикозов представлены в заключительной главе диссертации. При использовании ряда объективных показателей чувствительности, специфичности и

диагностической эффективности ПЦР и традиционных методов диагностики диссертантом убедительно показано, что разработанные тест-системы на основе ПЦР позволяют обнаружить *M. canis*, *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* в клинических образцах с более высокой диагностической эффективностью, чем при использовании традиционных методов.

В заключении автор подводит итоги проведенного исследования, указывая на необходимость внедрения в практику здравоохранения и ветеринарного надзора молекулярно-генетических методов диагностики микроспории и трихофитии. Это обеспечит эффективную и достоверную экспресс-диагностику при существенном сокращении времени анализа.

В четырех выводах представлены основные результаты проведенных исследований.

Автореферат диссертации полностью отражает содержание работы, соответствующей специальности 03.02.03 – микробиология.

Основная часть диссертационных исследований выполнена при личном участии автора.

Анализ диссертации Т.Н. Титовой свидетельствует о ее значительной научной новизне. Автором впервые сконструированы три видоспецифические тест-системы для ранней диагностики микроспории и трихофитии, основанные на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей генов возбудителей и подбора праймеров для ПЦР. Теоретическая и практическая значимость работы несомненна. Приоритетность полученных автором результатов подтверждена тремя патентами РФ на изобретения.

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием адекватных методов исследования и сертифицированного оборудования.

Результаты диссертационной работы были представлены на многих конгрессах и научно-практических конференциях. По теме диссертации опубликованы 14 работ, в том числе две – в изданиях, рекомендованных ВАК

Министерства образования и науки Российской Федерации для изложения результатов диссертационных работ.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Отмеченные ранее недочеты не влияют на общую высокую оценку работы.

Таким образом, диссертация Титовой Татьяны Николаевны «Разработка и оценка информативности нового способа детекции *Microsporium canis*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, связанной с конструированием эффективных тест-систем для диагностики дерматомикозов. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости она отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник отдела микробиологии
Федерального казенного учреждения здравоохранения

«Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт» Федеральной службы

по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, д. 7

Тел: (8442) 37-37-74

E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Заслуженный деятель науки Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор

 А.В. Липницкий

Подпись А.В. Липницкого заверяю

Начальник отдела кадров

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора





Н.В. Бяхова