

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Шпака Ивана Михайловича

на тему: «Генотипирование штаммов возбудителя гистоплазмоза»

по специальности 03.02.03 – микробиология

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Актуальность темы диссертационного исследования

В последние годы инфекционные патологии, вызванные микроскопическими грибами, приобретают всю большую и большую актуальность. По данным Всемирного фонда борьбы с грибковыми инфекциями (GAFFI) инвазивные микозы являются причиной более 1,5 миллионов смертей в год. Несмотря на то, что гистоплазмоз принято относить к эндемичным микозам, характерным для стран с жарким и влажным климатом, в настоящее время CDC (Центр по контролю и профилактике заболеваний США) говорит о гистоплазмозе как о глобальном микозе, представляющем актуальную проблему мирового здравоохранения. Помимо мест природной очаговости случаи гистоплазмоза регулярно регистрируются в различных климатических зонах, в том числе на территории всей Европы. В настоящее время из-за отсутствия масштабных эпидемиологических исследований истинная картина глобального распространения возбудителя заболевания *Histoplasma capsulatum* не известна. На территории РФ, насколько мы располагаем данными, официально зарегистрирован один случай завозного гистоплазмоза с Африканского континента. Но следует отметить, что в микологической практике отечественных исследователей встречаются случаи подозрения на гистоплазмоз, которые не имеют подтверждения в силу отсутствия у многих микологических лабораторий разрешения на работу со II группой патогенности. Случаи гистоплазмоза, не связанные с эндемичными районами, многообразие клинических проявлений, трудности диагностики позволяют предполагать, что гистоплазмоз встречается, по-видимому, не так редко, как диагностируется. Популярность туристических поездок в страны эндемики гистоплазмоза, отсутствие исследований по оценке распространения *Histoplasma capsulatum* в РФ (в почве, др. субстратах) на фоне повсеместного нарастания бремени микозов позволяют предполагать возможность инвазии *Histoplasma capsulatum* на территорию нашего государства, что требует проведения профилактических мероприятий и наличия арсенала методик для достоверной идентификации и дальнейшего типирования этого опасного возбудителя.

Следует отметить, что основную группу риска развития инвазивных микозов составляют иммунокомпрометированные пациенты. Дефекты в клеточно-опосредованном иммунитете, особенно снижение количества CD4+ лимфоцитов, - ключевой фактор возникновения микозов, вызванных как оппортунистическими грибами, так и первичными

патогенами. За последние несколько десятилетий одной из важнейших проблем как мирового так и российского здравоохранения стала эпидемия ВИЧ/СПИД. Существует ряд индикаторных микозов СПИД: одна из основных причин летальности у ВИЧ-инфицированных пациентов, среди них выделяют гистоплазмоз, характерный для стран Центральной и Южной Америки и криптококкоз – Европы, России. Несмотря на широкое внедрение антиретровирусной терапии, которая резко сократила число СПИД пациентов в мире, *Cryptococcus neoformans/gattii* и *Histoplasma capsulatum* остаются серьезной проблемой для данной категории больных.

Микроскопические грибы обладают пластичным геномом, способным к приобретению мутаций, хромосомным абберациям, изменению копииности генов, то есть к большому потенциалу дивергенции популяции внутри вида, позволяющему микромицетам адаптироваться под изменение условий внешней среды, воздействие антимикробных агентов, переходить от сапробного состояния к факультативному или облигатному паразитизму. В настоящее время известно, что существует ряд генетически расходящихся линий (клад) внутри вида *Histoplasma capsulatum*, некоторые из которых в настоящее время предлагают выделить даже в отдельные виды. Точная идентификация генетических линий представляет не только таксономический интерес, но и клиническую значимость – пациенты, инфицированные различными подвидами *Histoplasma capsulatum*, могут иметь различные как факторы риска развития заболевания, так и клинический исход, в связи с эти вопросы глобальной молекулярной эпидемиологии гистоплазмоза требуют пристального внимания. Исследование этиопатогенеза инфекции, вызванной *Histoplasma capsulatum*, на уровне генома позволит изучить микроэволюционные процессы видообразования *Histoplasma spp.*, представить структуру глобальной популяции возбудителя, разграничить генетические линии и оценить видовое разнообразие и их чувствительность к антимикотическим препаратам не только фенотипически, но и генетически, что, в свою очередь, будет способствовать сдерживанию этой смертельной болезни.

Применение методов NGS-секвенирования безусловно помогает исследователям получать наиболее полную информацию о генетической структуре микроорганизмов, в том числе микроскопических грибов, но несмотря на совершенствование методик секвенирования последнего поколения, удешевления расходных материалов, они все равно остаются дорогостоящими для использования в рутинной клинической практике и недоступными для широкого круга исследователей, поэтому в настоящее время существует актуальная потребность в разработке быстрой, легко исполнимой методики без больших финансовых затрат практически для всех клинически значимых микромицетов.

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

Положения, выносимые на защиту и выводы, сформулированные в диссертации, научно обоснованы. В работе проведен тщательный биоинформационный анализ данных, полученных при использовании различных праймеров при генотипировании штаммов *Histoplasma capsulatum* методами на основе амплификации ДНК (при апробации RAPD метода изучено три комбинации праймеров; методики амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК (DFR) – 32 пары праймеров для оценки 5 переменных участков генома), на основании проведенной работы предложены оптимальные схемы внутривидового типирования. Также в работе подтверждена высокая переменность нуклеотидной последовательности гена *ms8* и перспективность использования данного локуса при проведении МЛСТ (мультилокусного сиквенс-типирования) для повышения дифференцирующей способности метода.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и подтверждается достаточным и репрезентативным объемом штаммов *Histoplasma capsulatum*, имеющимся в коллекции ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, которые были в распоряжении диссертанта, проведением экспериментов в нескольких повторах, использованием современных методов исследования и применением адекватных методов статистической обработки данных. Безусловно, увеличение объема экспериментального материала (тестируемых штаммов) позволит в дальнейшем оценить и повысить аналитическую и клиническую эффективность и специфичность разрабатываемых методов молекулярно-генетического анализа внутривидовой дифференциации клинических изолятов *Histoplasma capsulatum*. Но для этого необходимо проведение дополнительных эпидемиологических исследований по представленности *Histoplasma capsulatum* на территории РФ и организация микологического мониторинга туристов, возвращающихся из эндемичных для *Histoplasma capsulatum* районов, и пациентов, инфицированных ВИЧ и с хроническими заболеваниями легких (таких как туберкулез).

Новаторство представляемого диссертационного исследования заключается, в первую очередь, в разработке методики амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК (DFR) с привлечением 7 переменных локусов, ранее не используемой для внутривидового типирования клинических изолятов *Histoplasma capsulatum*. В ходе

работы впервые была создана библиотека дифференцирующих регионов генома микроскопических грибов *Histoplasma capsulatum*, состоящая из 204 переменных регионов, для их анализа были апробированы 32 пары олигонуклеотидных праймеров. Кроме того, автором был оптимизирован, повышена разрешающая способность МЛСТ: предложен дополнительный информативный локус *ms8*. Несмотря на то, что использование комбинации праймеров при проведении RAPD анализа позволяет повысить разрешающую способность метода - доказанный факт и не подлежит к защите и праймеры, используемые в работе были ранее опубликованы, автором также была проделана большая работа по оптимизации схемы проведения RAPD с указанными праймерами, позволяющая значительно повысить эффективность применяемой методики.

Научные положения и выводы подтверждаются результатами теоретического анализа научной литературы и биоинформационной обработкой собственных эмпирических данных.

Практическая значимость результатов

В 60-х годах прошлого столетия с выдающихся трудов Луиджи Луки Кавалли-Сфорца, Эмиля Цукеркандля, Лайнуса Полинга и Вилли Хеннинга сформировалось новое направление исследований – «молекулярная филогенетика», до этого времени этиология микозов изучалась морфологическими и биохимическими подходами. Внедрение молекулярных методов позволило внести радикальные изменения в номенклатурный код микромицетов: отказаться от двойной номенклатуры плеоморфных грибов в пользу единственной системы имен. Но и до настоящего времени применение методов молекулярно-генетического типирования имеет несомненно высокую практическую значимость. Так как в мировой литературе существует ограниченное количество работ, посвященных разнообразию гриба *Histoplasma capsulatum*, и его таксономическое положение до настоящего времени остается неустойчивым: количество генетически обособленных географических и иных популяций (или филогенетических видов) постоянно изменяется по мере внедрения новых молекулярно-генетических подходов и расширения числа изученных штаммов, проводимая работа позволит пополнить арсенал методологических подходов к дифференциации штаммов возбудителя гистоплазмоза, оптимизировать схемы типирования, что в свою очередь в последующем ляжет в основу реконструкции филогенетических отношений внутри комплекса *Histoplasma capsulatum*.

Дальнейшая научно-исследовательская работа, направленная на изучение генетического разнообразия этого уникального объекта, позволит выявить микроэволюционные процессы, направленные на совершенствование микромицетов как

патогенов и формирование резистентности к антимикотикам, что может быть транслировано на широкий спектр видов микроскопических грибов – потенциальных патогенов человека.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Шпак И.М. изложена на 111 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 2 глав результатов собственных исследований (генетического типирования штаммов *Histoplasma capsulatum*), главы, посвященной сравнительному анализу дифференцирующей способности методов внутривидового типирования, применяемых в работе, заключения, выводов, списка литературы, а также приложения, иллюстрирована 22 рисунками и 6 таблицами. Перечень используемой литературы включает 172 источников, в том числе 6 отечественных и 166 зарубежных.

Автореферат и публикации достаточно полно отражают содержание и основные положения представленной работы.

Обзор литературы отражает современное состояние проблемы, хорошо структурирован, логично составлен и дает достаточно полное представление об истории изучения и характеристике возбудителя гистоплазмоза, глобальном распространении *Histoplasma capsulatum*, характеристике его генома и отдельных генов, методах молекулярно-генетического типирования штаммов. Подробно описаны подходы генотипирования на основе метода ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD) и МЛСТ, которые автор использует в своей экспериментальной работе. Также дается подробное описание современной молекулярной филогенетической классификации изучаемого микромицета.

В главе материалы и методы приводится описание штаммов микроорганизмов, используемых в работе, методов культивирования, подготовки проб для ПЦР. Из молекулярно-генетических методов подробно описано выделение ДНК, по остальным методам приведены ключевые этапы, это вполне оправдано, так как детальное описание алгоритмов методов типирования, используемых праймеров и т.п. приводится в главах, посвященных результатам исследования. Приведены программные продукты, используемые в работе, и методы биоинформационного анализа.

Главы собственных результатов разделены на три части: генотипирование штаммов на основе амплификации ДНК, генетическое типирование с использованием таргетного секвенирования и сравнение результатов различных методов генотипирования штаммов *Histoplasma capsulatum*. В результатах приведены схемы оптимизации и

разработки методик для внутривидового типирования: RAPD, DFR и МЛСТ, детальное описание условий проведения реакции, используемых реагентов, праймеров.

Диссертанту удалось не только показать дифференцирующую способность разрабатываемых подходов молекулярно-генетического анализа, но и провести исследования, направленные на сопоставимость данных, полученных разными методами типирования, и сравнительную оценку изучаемых методов, представить положительные и отрицательные характеристики каждого подхода для внутривидового типирования.

В качестве сильной стороны работы следует подчеркнуть, что в ходе исследований Шпака И.М. был получен целый ряд новых и оригинальных данных. Впервые разработан быстрый, простой метод типирования DFR для выяснения внутривидовых различий штаммов *Histoplasma capsulatum* и предложен дополнительный локус для повышения разрешающей способности метода МЛСТ.

Хочется отметить тщательность и аккуратность в оформлении работы, хороший язык. Работа читается легко и оставляет приятное впечатление в целом.

Замечания и вопросы

Среди замечаний стоит отметить, что обзор литературы в основном строится на цитировании литературы 2012-2014 годов, полностью отсутствуют ссылки на литературные источники последних двух лет. Несмотря на то, что филогенетические отношения внутри комплекса *Histoplasma capsulatum* за это время не подверглись изменениям, все же привести несколько свежих источников автору стоило.

Также в тексте встречаются некорректные небрежности обороты. Так на странице 4 автор пишет: «гистоплазмоз – это наиболее распространенный микоз в мире». В настоящее время самым распространенным микозом в мире является опистхорхоз, от которого, по данным исследователей, страдает 20% населения в популяции старше 60 лет, и это показатель возрастает до 50% у лиц старше 70 лет. По всей видимости, автор подразумевал, что гистоплазмоз – самый распространенный среди глубоких микозов.

В обзоре литературы автор детально приводит данные по распространению *Histoplasma capsulatum* по всему миру, совершенно не описывая ситуацию в нашей стране (кроме фразы: «исследований по изучению ареала распространения *Histoplasma capsulatum* не проводили»). Хотелось бы узнать, есть ли какая-то информация о случаях гистоплазмоза в РФ? Возможны ли только завозные случаи или можно ожидать автохтонные вспышки в связи с современными представлениями о глобальном распространении возбудителя?

Автор использовал в работе коллекционные штаммы ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института 60-х, начала 90-х годов. А за

последние 25 лет коллекция новыми штаммами не пополнялась? Как отмечалось выше, геном микромицетов очень пластичен, и за такой срок изоляты *Histoplasma capsulatum*, циркулирующие в окружающей среде, могли накопить новые мутации, могли возникнуть новые генетические линии. Конечно, на совершенствование методических подходов для изучения внутривидового разнообразия (что является целью данной работы) этот факт, безусловно, не оказывает влияния, но для дальнейших эпидемиологических исследований, анализа процессов дивергенции внутри вида было бы интересно оценить современную геномную информацию клинических изолятов *Histoplasma capsulatum* в сравнении с коллекционными штаммами прошлого столетия.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании всех исследований и экспериментов, биоинформатической и статистической обработке полученных результатов. Автором лично проведен сравнительный анализ последовательностей геномов штаммов возбудителя гистоплазмоза, опубликованных в общедоступных генетических базах данных, выбраны потенциальные мишени для внутривидового типирования, проведено сравнение дифференцирующей способности различных произвольных праймеров и отработаны параметры ПЦР для получения высокоинформативных RAPD-паттернов, выявлены дифференцирующие последовательности геномов и создан набор олигонуклеотидных праймеров для типирования штаммов возбудителя гистоплазмоза методом DFR. Автором лично проведен сравнительный анализ дифференцирующей способности различных методов внутривидового типирования штаммов *Histoplasma capsulatum*, показана сопоставимая эффективность методов RAPD и МЛСТ. Автором подготовлены документы для патентования праймеров, используемых для типирования штаммов *Histoplasma capsulatum* методами DFR и МЛСТ.

Полнота опубликования результатов

Основные положения диссертации полностью опубликованы в 9 печатных работах автора (в том числе 3 в журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ»), также соискатель является соавтором в 1 монографии, посвященной возбудителям особо опасных микозов. Получены два патента на изобретения: запатентованы уникальные последовательности праймеров, разработанные автором в ходе выполнения работы для типирования штаммов

Histoplasma capsulatum методами DFR и МЛСТ. Промежуточные материалы доложены на региональных, всероссийских и международных конференциях, симпозиумах и съездах.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Шпака Ивана Михайловича является целостной, завершенной научно-квалификационной работой, в которой изложены новые научно обоснованные технологические решения для изучения внутривидового разнообразия штаммов *Histoplasma capsulatum* с применением комплекса современных молекулярно-генетических методов, необходимые для эпидемиологических исследований гистоплазмоза и с целью предотвращения данной опасной грибковой инвазии (и ее возможного дальнейшего распространения) на территорию Российской Федерации, имеющие существенное значение для Здравоохранения Российской Федерации в целом, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

«14» мая 2019 г.

Официальный оппонент,
кандидат биологических наук,
заведующий НИЛ молекулярно-генетической микробиологии
НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
Адрес: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба 1/28,
НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина
Тел. +7-812-303-51-40
E-mail: anastasiya.taraskina@szgmu.ru

Тараскина А.Е.

Подпись заверяю

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Минздрава России
д.м.н., доцент



Бакулина Н.В.

/Печать организации/