

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 12.11.2021 г. № 28
о присуждении Буй Тхи Лан Ань, гражданину Социалистической Республики
Вьетнам, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Характеристика штаммов *Burkholderia pseudomallei* и
близкородственных буркхольдерий, выделенных на территории
Социалистической Республики Вьетнам, и совершенствование алгоритмов их
идентификации» по специальности 1.5.11 – микробиология принята к защите
20.08.2021 г., протокол № 18, диссертационным советом 64.1.002.01, созданным
на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный
научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Российской Федерации, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск,
Территория «Квартал А», приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г., с
изменениями в соответствии с приказом Минобрнауки от 03.06.2021 г. №561/нк.

Соискатель Буй Тхи Лан Ань, 1982 г. рождения, в 2008 г. окончила
магистратуру Государственного образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Московская государственная академия тонкой
химической технологии имени М. В. Ломоносова» по направлению «химическая
технология и биотехнология». В 2016 – 2021 гг. Буй Тхи Лан Ань являлась
соискателем, прикрепленным к лаборатории патогенных буркхольдерий
Федерального казенного учреждения здравоохранения Волгоградский научно-
исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, с 2015 г. по
настоящее время работает в должности научного сотрудника института медико-

биологических проблем Научно-технологической организации международного сотрудничества «Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и Министерства обороны Социалистической Республики Вьетнам.

Диссертация выполнена в лаборатории патогенных буркхольдерий Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Институте медико-биологических проблем Научно-технологической организации международного сотрудничества «Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и Министерства обороны Социалистической Республики Вьетнам.

Научный руководитель – кандидат биологических наук (специальность 1.5.11 – микробиология), доцент Захарова Ирина Борисовна, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория патогенных буркхольдерий, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория туляремии, главный научный сотрудник,

Заднова Светлана Петровна, доктор биологических наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российской научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и

благополучия человека Российской Федерации, лаборатория патогенных вибрионов, ведущий научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Ставрополь, в своем положительном заключении, подписанном Малецкой Ольгой Викторовной, доктором медицинских наук, профессором, заместителем директора по научной и противозидемической работе, Василенко Надеждой Филипповной, доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником лаборатории эпидемиологии и Волинкиной Анной Сергеевной, кандидатом биологических наук, заведующим лабораторией диагностики вирусных инфекций, указала, что диссертационная работа Буй Тхи Лан Ань выполнена на актуальную тему, является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи комплексного изучения диагностически значимых генетических и фенотипических особенностей вьетнамских природных и клинических штаммов *B. pseudomallei*, имеющей существенное значение для совершенствования лабораторной диагностики мелиоидоза, и полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к кандидатским диссертациям, соответствует паспорту специальности 1.5.11 – микробиология, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по заявленной специальности.

Соискатель имеет **33** опубликованные работы, в том числе по теме диссертации опубликовано **16** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **2** работы. Общий объем работ – 14,4 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Bui, L.A.T.** The Complexity of the identification of *Burkholderia cepacia* strain which caused septicemia / **L.A.T. Bui**, I. Zakharova, I. Shpak, N. Teteryatnikova, D. Ustinov, Y. Kuzyutina, H.N. Nguyen, D. Viktorov // Jundishapur

Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 11, N 11. – P. e82834. – DOI: 10.5812/jjm.82834. (WoS и SCOPUS)

2. Фролов, Д.М. Разработка теста латекс-агглютинации для выявления патогенных буркхольдерий и его апробация в эндемичных регионах Вьетнама /Д.М Фролов, Н.Н. Тетерятникова, **T.L.A. Bui**, И.Б. Захарова, Н.П. Храпова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – №4. – С.133-138. (SCOPUS)

На диссертацию и автореферат поступило **4** положительных отзыва без замечаний от: **(1)** канд. биол. наук **Марченко Василия Юрьевича**, заведующего лабораторией отдела зоонозных инфекций и гриппа Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; **(2)** д-ра мед. наук **Замараева Валерия Семеновича**, профессора кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии с курсом клинической микробиологии Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава Российской Федерации, **(3)** д-ра биол. наук **Монаховой Елены Владимировны**, главного научного сотрудника отдела микробиологии холеры и других кишечных инфекций «Ростовского-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора»; **4)** канд. биол. наук **Голицыной Людмилы Николаевны**, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций «Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора».

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что

д-р мед. наук **Павлович Наталья Владимировна** является признанным специалистом в области микробиологии особо опасных инфекций и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Буй Т.Л.А. (**Антибиот. Химиотер.** – **2021.** – Т. 66, № 1-2. – С. 26-32; **2019.** –Т. 64, № 7-8. – С. 8-12; **Наука Юга Росс.** – **2020.** – Т. 16, № 1. – С. 77-87; **Chem. Heterocycl. Comp.** – **2019.** – Т. 55, № 11. – С. 1128-1130; **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинн.** – **2019.** – Т. 15, № 1. – С. 42-46; **Инф. Иммунол.** – **2019.** – Т. 9, № 2. – С. 262-272; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – **2017.** –

№ 4. – С. 92-96; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2016. – № 1. – С. 22-29);

д-р биол. наук **Заднова Светлана Петровна** является признанным специалистом в области микробиологии и генетики особо опасных инфекций и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Буй Т.Л.А. (**Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2019. – № 2. – С. 25-30; 2017. – № 6. – С. 105-113; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2019. – № 2. – С. 62-68; 2019. – № 3. – С. 19-25; 2017. – № 2. – С. 40-44; 2016. – № 1. – С. 97-101; 2016. – № 4. – С. 75-78). **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинн.** – 2019. – Т. 15, № 1. – С. 53-58; **Мол. Ген. Микробиол. Вирусол.** – 2017. – Т. 35, № 2. – С. 64-69; **Эпидемиол. Инф. Бол.** – 2016. – Т. 21, № 4. – С.225-233;

Назначение ведущей организации обосновано наличием большого опыта ее специалистов в совершенствовании лабораторной диагностики и генотипирования возбудителей особо опасных инфекций (**Genomics.** – 2021. – Т. 113, № 4. – С. 1952-1961; **Генетика.** – 2021. – Т. 57, № 6. – С. 711-720; 2019. – Т. 55, № 1. – С. 40-51; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2021. – Т. 98, № 1. – С. 46-58; 2020. – № 4. – С. 331-338; **Здор. Насел. Среда Обитан.** – 2020. – № 12 (333). – С. 56-61; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2020. – № 3. – С. 83-88; 2019. – № 3. – С. 43-50; **ВМС Genom.** – 2019. – Т. 20, № 1. – С. 692; **ВМС Microbiol.** – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 165).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны лабораторные протоколы для выявления *B. pseudomallei* методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и петлевой изотермической амплификации (LAMP), со 100%-ой специфичностью для чистых культур при аналитической чувствительности 10^4 и 10^3 м.к./мл;

предложена простая процедура выделения возбудителя мелиоидоза из почвы, включающая в себя приготовление суспензии почвы на стерильной дистиллированной воде, инкубацию при комнатной температуре до оседания крупной фракции (от 30 мин) с последующим высевом надосадочной жидкости на агар Эшдауна;

доказано, что вьетнамские штаммы *B. pseudomallei* обладают расширенным диапазоном вариабельности фенотипических свойств, имеющих диагностическое значение: обнаружено отсутствие единого для большинства штаммов доминантного морфотипа колоний, впервые описан морфотип В («пуговицы»), обнаружены штаммы полностью (3,2 %) или частично (4,8 %) утратившие диагностически значимый признак резистентности к гентамицину; высоким уровнем внутривидового полиморфизма консервативных генов ацетил-коэнзимА-редуктазы *ace*, глутамат-синтазы *gltB*, АДФ-Л-глицеро-D-манногептозо-6-эпимеразы *gmhD*, ГТФ-связывающего элонгационного фактора *lepA*, синтетазы липоевой кислоты *lipA*, нитрит-экструзионного белка *narK* и НАДН-дегидрогеназы *ndh*, входящих в схему мультилокусного сиквенс-типирования *B. pseudomallei* MLST;

введены новые понятия о генетическом разнообразии вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза и неслучайном распределении штаммов *B. pseudomallei* определенных по макрорегионам страны: в Северном регионе сиквенс-типов ST46, ST201, ST351, ST541, ST549, ST858 и STnew6, в Центральном – ST16, ST41, ST46, ST70, ST85, ST351, ST389, ST500, ST507, ST654, ST948, ST1051, ST1566, ST1567, STnew1, ST1650(new2), STnew3, STnew4 и STnew5, общих для обоих макрорегионов – ST46 и ST351;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что в популяции вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* продолжают эволюционные события, приводящих к формированию новых, так называемых «молодых» сиквенс-типов (STnew1, ST new2, STnew3, STnew4, STnew5 и STnew6), обнаруженных автором диссертационной работы. Новые ST сиквенс-типы имеют ограниченное географическое распространение (до настоящего времени только во Вьетнаме) и «терминальную локализацию» на филогенетических деревьях *B. pseudomallei*, что подтверждает гипотезу о том, что субрегион Меконга (Таиланд, Лаос, Камбоджа и Вьетнам) исторически являлся горячей точкой эволюции *B. pseudomallei* в Юго-Восточной Азии;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (выделение *B. pseudomallei* и близкородственных

буркхольдерий из почвы в виде чистых культур, определение чувствительности изолятов к антибактериальным препаратам, биохимическое профилирование штаммов), молекулярно-генетических (выделение нуклеиновых кислот, идентификация возбудителя методом ПЦР, полногеномное и частичное секвенирование, мультилокусное сиквенс-типирование), биоинформатических (сборка и аннотация геномов, определение аллелей локусов по схеме MLST, филогенетический анализ) и методов статистического анализа (с использованием инструмента «регрессия» Microsoft Excel 2013).

изложены молекулярные механизмы, опосредующие полную (*B. pseudomallei* 15QB1V1512) или частичную (*B. pseudomallei* 16QT2V1607 и 16QT3V1608) утрату диагностически значимого признака резистентности к гентамицину. Обнаружены новые аминокислотные замены в периплазматическом линкере AmrA эффлюкс-насоса семейства RND AmrAB-OprA: ARG160SER, Arg116Gln, Gly237Arg и Thr317Lys, в репрессоре оперона AmrAB-OprA AmrR: Val222Met, что расширяет представление о причинах появления чувствительных к гентамицину штаммов *B. pseudomallei*;

раскрыто, что фенотипические методы идентификации *B. pseudomallei*, используемые в клинических лабораториях Вьетнама (метод презумптивной идентификации по морфологии колоний, характеру окраски по Граму, оксидазной активности и чувствительности к антибиотикам и использование биохимических анализаторов), не обладают достаточной диагностической эффективностью и, в большинстве случаев, не выявляют атипичные штаммы возбудителя мелиоидоза;

изучены клинические и природные штаммы возбудителя мелиоидоза, выделенные в провинциях Центрального Вьетнама (Nghe An, Quảng Trị и Quảng Bình) и Северного Вьетнама (Yen Bai, Vinh Phuc, PhuTho и Bac Giang) в 2015-2020 гг.;

проведены мультилокусное сиквенс-типирование и филогенетический анализ аллельных профилей, показавшие, что 14 клональных комплексов, включающих в себя сиквенс-типы выделенных во Вьетнаме штаммов *B. pseudomallei* ST18, ST682, ST398, ST1138, ST306 ST95, ST93, ST192, ST70, ST389, ST50, ST56, ST54 и ST1051, включают в себя также сиквенс-типы,

идентифицированные в других эндемичных по мелиоидозу регионах мира - Австралии, Юго-Восточной, Восточной и Южной Азии, Африке и Латинской Америке.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены в деятельность Референс-центра по мониторингу за возбудителями мелиоидоза и сапа «Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора» методические приемы по выделению *B. pseudomallei* из объектов внешней среды и созданный в рамках диссертационной работы Буй Тхи Лан Ань набор охарактеризованных штаммов *Burkholderia* spp. (Справка № 34-30-02/12-5765-2021 от 05.08.2021 г.) – международный уровень внедрения;

определены перспективы разработанных способов генодиагностики возбудителя мелиоидоза, основанных на использовании методов LAMP и ПЦР детекции для практического использования в Социалистической Республике Вьетнам;

создана коллекция из 109 клинических и 27 почвенных изолятов возбудителя мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий из различных регионов Социалистической Республики Вьетнам, обеспечивающая представительный набор штаммов для тестирования разрабатываемых средств обнаружения *B. pseudomallei*, а также изучение генетических и фенотипических особенностей штаммов вьетнамской популяции возбудителя. Полногеномные последовательности 14 штаммов депонированы в международной базе данных GenBank NCBI, аллельные профили 16 штаммов *B. pseudomallei* и одного штамма *B. ceracia* – в базе данных PubMLST – международный уровень внедрения;

представлен алгоритм скрининга образцов внешней среды на присутствие *B. pseudomallei*, включающий в себя этапы пробоподготовки, посева на агар Эшдауна с гентамицином и без него, инкубацию при температуре 42 °С, отбор колоний, резистентных к полимиксину В и чувствительных к амоксициллин/клавуланату, выделение ДНК и проведение ПЦР тестирования (Практическое руководство «Лабораторный скрининг и идентификация

Burkholderia pseudomallei» под ред. А. В. Топоркова, А. Н. Кузнецова, Х. Зы Нгуен. – Волгоград: Волга-Пресс, 2018. – 96 с. издано на русском и вьетнамском языках) - международный уровень внедрения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены на сертифицированном оборудовании и подвергнуты статистической обработке;

идея диссертационного исследования клинических и природных штаммов *B. pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных на территории Социалистической Республики Вьетнам, опирается на опубликованные труды ведущих мировых специалистов в области лабораторной диагностики мелиоидоза, биологии его возбудителя, а также международно принятые рекомендации по стратегии отбора проб для изоляции *B. pseudomallei* из почвы;

установлена корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, в частности, по высокой вероятности ошибочной идентификации биохимическими анализаторами атипичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. cepacia*; частичная корреляция – по участию эффлюксных насосов семейства RND в природной резистентности возбудителя мелиоидоза к гентамицину.

использованы современные методы получения, обработки и визуализации данных: программы Primer-BLAST NCBI, Primer Explorer V4, SPAdes v. 3.1.0, MaSuRCA v. 3.3.2, NCBI PGAP v. 4.10, MEGA 7.

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы, планирование экспериментов, бактериологические и молекулярно-генетические эксперименты, биоинформатический анализ, апробация результатов исследования, обработка, оформление и публикация результатов.

На заседании 12.11.2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Буй Т.Л.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **19** человек, из них **9** докторов наук по специальности 1.5.11 – микробиология,

участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 19, против 0, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор

(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н., доцент

(Хохлова Ольга Евгеньевна)



Дата оформления Заключения – 12.11.2021 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.