

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Буй Тхи Лан Ань** «Характеристика штаммов *Burkholderia pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных на территории социалистической республики Вьетнам, и совершенствование алгоритмов их идентификации», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Актуальность диссертационной работы.

Burkholderia pseudomallei является сапрофитной бактерией, обитающей во влажной почве тропических и субтропических стран и вызывающей тяжелую инфекционную болезнь человека и животных – мелиоидоз. Данная болезнь имеет разнообразные клинические проявления и трудно диагностируется. Недавно проведенное математическое моделирование и анализ эпидемиологической ситуации продемонстрировало широкое распространение возбудителя в странах с тропическим климатом. Высказывается предположение, что от данной инфекции ежегодно умирает 90000 человек (Virk et al., 2020). Документально подтверждено масштабное распространение мелиоидоза и во Вьетнаме. Несмотря на то, что первые случаи болезни были описаны почти сто лет назад (в 20-х годах прошлого столетия), долгое время среди вьетнамского населения мелиоидоз выявлялся спорадически. Улучшение диагностики удалось достичь, начиная с 2014 года, в результате проведения просветительской работы с врачами и сотрудниками диагностических лабораторий в рамках выполнения исследовательского проекта RENOMAB (Research Network on Melioidosis and *Burkholderia pseudomallei*), а также при внедрении в клиническую практику протокола презумптивной идентификации *B. pseudomallei*, основанного на оценке характера окраски бактериальных клеток по Граму, оксидазной активности и чувствительности к четырем антибиотикам. В настоящее время ситуация по мелиоидозу во Вьетнаме остается напряженной, существует ряд актуальных и требующих решения проблем как эпидемиологического, так и микробиологического характера. В том числе необходима разработка национальных руководств по диагностике и лечению мелиоидоза, более широкие исследования геномного разнообразия штаммов *B. pseudomallei*, циркулирующих в разных провинциях, изучение распространения возбудителя во внешней среде. Учитывая вышесказанное, проведенное Буй Т.Л.А. диссертационное исследование, посвященное комплексному изучению диагностически значимых генетических и фенотипических особенностей вьетнамских природных и клинических штаммов *B. pseudomallei*, является актуальным и своевременным.

Достоверность и новизна работы.

Достоверность представленных в диссертации экспериментальных данных подтверждается воспроизводимостью результатов, полученных в нескольких повторах. Материал статистически обработан. Работа выполнена на сертифицированном оборудовании с применением высокочувствительных микробиологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов.

Используя комплексный подход, включающий изучение фенотипических и молекулярно-генетических свойств штаммов *B. pseudomallei*, а также современные методы анализа, диссертанту удалось получить ряд новых данных. Впервые при проведении сравнительного анализа штаммов *B. pseudomallei* из Вьетнама с хорошо изученными изолятами из северо-восточного Таиланда показан широкий диапазон морфологической вариабельности вьетнамских штаммов. Выявлено отсутствие единого для популяции доминантного морфотипа (у разных штаммов ключевыми являются разные морфологические варианты колоний), а также обнаружены морфотипы, не представленные в штаммах северо-восточного Таиланда.

Заслуживает внимания факт выявления на территории Вьетнама штаммов *B. pseudomallei* полностью или частично утративших диагностически значимый признак резистентности к гентамицину, а также штаммов *B. thailandensis*, экспрессирующих *B. pseudomallei*-подобный капсульный полисахарид. У чувствительных к гентамицину изолятов впервые обнаружены аминокислотные замены в периплазматическом белке AmrA, который является составной частью эффлюкс-насоса AmrAB-OprA.

Впервые для дифференциации *B. pseudomallei* от непатогенных штаммов *B. thailandensis* предлагается использовать тест на утилизацию малоната, входящего в панель тестов для автоматизированного анализа.

Несомненным достоинством диссертации являются данные, полученные при молекулярно-генетическом анализе штаммов *B. pseudomallei*. Так при проведении МЛСТ-типирования выявлено 18 известных сиквенс-типов и 6 новых, нигде более не обнаруженных и имеющих терминальную локализацию на филогенетических деревьях. Клональные комплексы, включающие исследованные штаммы, содержат сиквенс-типы штаммов всех известных эндемичных по мелиоидозу регионов мира, причем в трех из них сиквенс-типы штаммов из Вьетнама являются комплексообразующими.

Установлена генетическая гетерогенность вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза как между двумя изученными макрорегионами страны (центральный и северный), так и внутри каждого из них.

Впервые для применения во Вьетнаме разработаны специфичные и высокочувствительные генодиагностические тест-системы, позволяющие выявлять и проводить идентификацию возбудителя мелиоидоза.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций.

Научные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации, сделанные в диссертации Буй Т.Л.А., являются обоснованными, так как базируются на полученных достоверных результатах. Диссертантом использовались методы, опубликованные в официальных источниках и апробированные другими исследователями.

Доказательством научной обоснованности является факт опубликования материалов диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях. Полученные в процессе выполнения диссертационной работы научные результаты прошли широкую апробацию – представлены на восьми всероссийских и международных конференциях, где получили одобрение ведущих специалистов. Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность Референс-центра по мониторингу за возбудителем мелиоидоза ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, что подтверждено справкой о внедрении.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.

Полученные автором экспериментальные данные подтверждают высказанную зарубежными исследователями гипотезу, что субрегион Меконга (Таиланд, Лаос, Камбоджа, Вьетнам) является горячей точкой для эволюции *B. pseudomallei* в Юго-Восточной Азии.

В результате проведенных исследований сформирована коллекция клинических и почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий, использованная для тестирования специфичности разработанных во ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора экспериментальных серий диагностикума для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа в реакции латекс-агглютинации и генодиагностического набора «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB». Несомненно, данный набор штаммов будет востребован и в дальнейшей работе Референс-центра по мониторингу за возбудителем мелиоидоза в указанном институте.

В международных базах данных GenBank NCBI и PubMLST депонированы нуклеотидные последовательности полных геномов 7 клинических и 6 почвенных штаммов *B. pseudomallei*, аллельные профили 16 штаммов *B. pseudomallei* и одного *B. ceracia*.

Экспериментальные данные, полученные при выполнении диссертационной работы, были использованы при составлении практического руководства «Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*» (под редакцией А.В. Топоркова, А.Н. Кузнецова, Х. Зы Нгуен. Волгоград, 2018).

Структура и содержание диссертации.

Диссертация, изложенная на 126 страницах компьютерного текста и иллюстрированная 27 рисунками и 17 таблицами, построена в традиционном стиле. Состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 122 источника, преимущественно последних годов выпуска.

Во введении обосновывается актуальность и степень разработанности выбранной темы исследования, сформулированы цель и задачи, представлены полученные новые данные, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту, методология и методы исследования, степень достоверности и апробация результатов, а также личное участие автора в получении результатов, публикации и структура диссертации.

Первая глава – обзор литературы (17 стр.), написана грамотно, понятным языком, структурирована (включает пять логически связанных подглав) и читается с интересом. В первых разделах приведены данные о систематическом положении, фенотипических свойствах и распространении возбудителя мелиоидоза. В последующих подробно описано генетическое разнообразие *B. pseudomallei*, методы лабораторной диагностики, их достоинства и недостатки. При этом отдельно выделен раздел, посвященный истории появления, изучения и диагностики мелиоидоза во Вьетнаме. После ознакомления с литературным обзором формируется четкое представление об изучаемом патогене и проблемах, существующих при его диагностике.

Глава 2 (11 стр.) «Материалы и методы» включает информацию об использованных в работе штаммах *Burkholderia* spp. и методах исследования. В работе использованы 136 клинических и выделенных из внешней среды изолятов, хранящихся в коллекции Института тропической медицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра. Применялись как классические (выделение возбудителя из различных проб, культивирование на питательном агаре, определение чувствительности к антибиотикам), так и современные (определение биохимического профиля на микробиологическом анализаторе, выделение ДНК, постановка ПЦР, полногеномное и фрагментарное секвенирование, сборка и аннотация генома)

микробиологические методы анализа. При описании биоинформационного анализа приведены ссылки на использованные программы и сайты. В целом глава информативна – в краткой форме изложены все использованные в работе методические приемы.

Глава 3 (11 стр.) посвящена формированию коллекции клинических и почвенных штаммов *Burkholderia spp.* Клинические штаммы были выделены в диагностических лабораториях госпиталей из 8 провинций центрального и северного районов Вьетнама. Почвенные штаммы возбудителя изолированы в естественных и аграрных биоценозах. Предварительно автором была проведена работа по выбору наиболее оптимального метода пробоподготовки для выделения культур *B. pseudomallei* из объектов внешней среды. При анализе 78 образцов почвы тремя разными методами было показано, что наиболее оптимальным является метод прямого культивирования, который и был применен в дальнейшей работе. В итоге для работы сформирована коллекция, включающая 114 клинических, 21 почвенный штамм *B. pseudomallei* и 6 изолятов *B. thailanlensis*. Необходимо отметить, что использованный диссертантом простой в исполнении, но при этом эффективный метод прямого культивирования проб внешней среды может быть востребован при создании карт риска заражения мелиоидозом человека и животных в разных регионах Вьетнама.

Выделенные из полевого материала при формировании коллекции почвенные штаммы *Burkholderia spp.* также нашли применение. Набор из 103 изолятов был использован для апробации диагностикума для латекс-агглютинации, созданного в ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Данный набор позволил провести проверку специфичности указанного препарата на свежевыделенных штаммах рода *Burkholderia*.

Учитывая, что в клинических лабораториях Вьетнама для определения видовой принадлежности штаммов от больных с подозрением на мелиоидоз используется метод презумптивной идентификации и биохимические тесты, что приводит иногда к получению некорректных результатов, следующий этап исследований был посвящен проверке видовой принадлежности штаммов генодиагностическими методами. В результате установлено, что из 114 клинических штаммов к виду *B. pseudomallei* относится 111, т.е. около 3 % штаммов первоначально были определены ошибочно.

Заслуживает внимания проведенная диссертантом работа по изучению влияния методов идентификации на эффективность выявления атипичных штаммов *B. pseudomallei*, показавшая, что биохимическое профилирование с использованием автоматического микробиологического анализатора VITEK® 2 и карт GN, широко практикующееся в клинических лабораториях Вьетнама, не выявляет до 75% атипичных

штаммов возбудителя мелиоидоза. В том числе к *B. pseudomallei* данная система относит и близкородственный, но непатогенный вид *B. thailandensis*. Однако автором было замечено, что эти два вида отличаются по ферментации малоната. Указанное отличие предлагается использовать для их дифференциации.

Заключительным этапом работы в данной главе было проведение идентификации штамма *B. ceracia* PT02, выделенного от больного с сепсисом, и первоначально отнесенного при биохимической идентификации в госпитале к *B. pseudomallei*. Скрупулезно проведенный Буй Т.Л.А. фенотипический и молекулярно-генетический анализ данного штамма доказал его принадлежность к *B. ceracia*.

Глава 4 – небольшой по объему (6 стр.), но важный раздел работы, включающий изучение у вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* вариабельности фенотипических признаков, имеющих диагностическое значение. Для сравнения были использованы данные, полученные при исследовании изолятов из Таиланда. В результате показано, что вьетнамские клинические штаммы возбудителя мелиоидоза, наряду с общими видовыми фенотипическими свойствами, обладают рядом отличительных особенностей и имеют более широкий диапазон морфологической изменчивости по сравнению с таиландскими. Выявлено отсутствие единого для популяции доминантного морфотипа, у разных штаммов преобладающими являлись разные морфотипы колоний. Кроме того, обнаружено присутствие нового варианта колоний, обозначенного автором как морфотип В.

Стоит отметить также важность исследований по выявлению штаммов возбудителя мелиоидоза полностью или частично утративших такой диагностически значимый признак как резистентность к гентамицину. Данный факт необходимо учитывать в практической работе при идентификации штаммов в клинических лабораториях.

Глава 5 (10 стр.) включает материал об изучении генетического разнообразия штаммов вьетнамской популяции *B. pseudomallei*. Автором было проведено мультилокусное сиквенс-типирование по схеме *VrcMLST* 30 клинических и 17 почвенных бактерий *B. pseudomallei*, выделенных в 7 провинциях центрального и северного Вьетнама. В результате исследованные штаммы были отнесены к 24 сиквенс-типам, среди которых выявлено 6 новых, не представленных в базе данных *PubNLST*. Проведенный в дальнейшем филогенетический анализ аллельных профилей исследованных штаммов и штаммов из базы данных *PubMLST* показал высокий уровень внутривидового полиморфизма консервативных генов среди вьетнамских штаммов возбудителя. Исследованные штаммы распределились по 14 клональным комплексам, при этом штаммы с новыми ST заняли маргинальное положение, что может свидетельствовать об

их недавнем возникновении и продолжающейся эволюции вьетнамских штаммов *B. pseudomallei*.

В Главе 6 (6 стр.) представлен материал по анализу генетических детерминант, обеспечивающих резистентность к аминогликозидам, у трех выявленных автором чувствительных к гентамицину изолятов *B. pseudomallei*. Показано, что изменение устойчивости к данному антибиотику коррелирует с присутствием точечных миссенс мутаций в генах трех известных эффлюкс-помп семейства RND и двух с неизвестными функциями, а также в гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы. Несомненно, получены новые сведения, но солидарна с автором, что для окончательного решения указанного вопроса необходимо проведение дальнейших исследований на большей выборке штаммов.

Глава 7 (24 стр.) завершает экспериментальную часть и посвящена разработке лабораторных протоколов для генодиагностики возбудителя мелиоидоза. В настоящее время во Вьетнаме для ПЦР-диагностики инфекции используют импортные наборы, поэтому одной из задач настоящей работы было создание собственных генодиагностических препаратов. В результате апробировано два лабораторных протокола на основе методов петлевой изотермической амплификации (LAMP) и ПЦР. В качестве мишени использовался ген *orf2*, входящий в кластер генов системы секреции третьего типа, который по данным зарубежных исследователей является уникальным для штаммов *B. pseudomallei*. Автором были рассчитаны праймеры, отработан температурный режим, определена эффективность и специфичность реакций. Показано, что разработанные протоколы ПЦР и LAMP при исследовании чистых культур обладают 100% специфичностью. При этом LAMP, имеющий более высокую чувствительность, перспективен для выявления возбудителя мелиоидоза из проб с низким содержанием бактерий, в частности, почвы. Однако ПЦР-протокол обладает более высоким показателем диагностической ценности, чем LAMP и рекомендуется для дальнейшего практического применения во Вьетнаме.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати.

Основные результаты диссертации изложены в 16 работах, из которых две статьи опубликованы в рецензируемых периодических журналах, индексируемых WoSCC и SCOPUS (одна в журнале, рекомендованном ВАК); 1 практическом руководстве, 1 коллективной монографии, 2 – в зарубежных журналах и 10 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций. В соответствующих журналах и сборниках все работы присутствуют, недостоверных сведений не выявлено. Считаю

необходимым отметить, что в двух статьях и двух тезисах Буй Тхи Лан Ань является корреспондирующим автором.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертации.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы в целом, замечания, вопросы.

К достоинствам диссертационной работы следует отнести комплексный характер проведенных экспериментальных исследований и логическое изложение материала рукописи. Ценность исследования состоит также в проведении работы на свежесыведенных штаммах *Burkholderia* spp, циркулирующих в современный период на эндемичной по мелиоидозу территории Вьетнама. Полученные при их изучении сведения важны не только для фундаментальной науки, но и для практического применения. Стоит также отметить использование в работе современных молекулярно-генетических методов, в которых автор великолепно разбирается, что указывает на высокий профессиональный уровень диссертанта. Данные по МЛСТ-типированию и филогенетическому анализу сопоставимы с мировым уровнем.

Личный вклад диссертанта в выполнение работы является решающим.

Замечания. Принципиальных замечаний по представленной диссертационной работе нет, присутствующие единичные опечатки не снижают высокого качества работы. Желательно было бы в таблице 6 (стр. 60-61) привести не диаметр зоны задержки роста штаммов *B. pseudomallei*, вызванное изучаемыми антибиотиками, а окончательный результат определения их чувствительности (резистентный, чувствительный, с промежуточной устойчивостью).

Возникшие вопросы:

- Классически комплекс «*B. pseudomallei*» включал виды *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*. В исследовании Lowe C-W с соавт. (2016) сообщалось о присоединении видов *B. oklahomensis*, *B. humptydooensis* и трех кладов, не имеющих видového статуса. В работе Janesomboon S.C. с соавт., опубликованной в 2021 году, указывается на присутствие в филогенетическом кластере «*B. pseudomallei*» шести видов (добавлен *B. singularis*). Как Вы считаете это окончательная классификация комплекса «*B. pseudomallei*» или возможна дальнейшая его корректировка?
- В результате проведенных исследований Вами обнаружено шесть штаммов *B. pseudomallei* с новыми сиквенс-типами, скажите, пожалуйста, такая локальная эволюция характерна только для клинических изолятов или для почвенных тоже?

– Штаммы *B. pseudomallei*, выделенные из районов центрального Вьетнама, обладают большим разнообразием комбинаций аллельных вариантов консервативных генов, входящих в схему MLST, по сравнению со штаммами из северных районов, чем это можно объяснить?

Заключение. Представленная к защите диссертационная работа Буй Тхи Лан Ань «Характеристика штаммов *Burkholderia pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных на территории социалистической республики Вьетнам, и совершенствование алгоритмов их идентификации» является научно-квалификационной работой, в которой представлены приоритетные данные о фенотипической и молекулярно-генетической характеристике современных штаммов *B. pseudomallei*, циркулирующих на эндемичной по мелиоидозу территории. Полученные экспериментальные данные важны для развития как фундаментальных исследований, так и востребованы в практической работе. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему и методическому уровню проведенных исследований работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент
Заднова Светлана Петровна
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории патогенных вибрионов
Федерального казенного учреждения здравоохранения
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»
Федеральной Службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46
тел. +7(8452) 26-47-23
e-mail: rusrap@microbe.ru

 С.П. Заднова

Подпись С.П. Задновой
заверяю:

начальник отдела кадров ФКУЗ «Российский
научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора



 О.В. Шумигой