

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Павлович Натальи Владимировны на диссертационную работу Буй Тхи Лан Ань на тему: «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 диссертационного исследования

Мелиоидоз - тяжелое инфекционное заболевание человека и широкого круга животных, эндемичные очаги которого сконцентрированы преимущественно в странах Юго-Восточной Азии и Австралии. При этом расширение туристического потока в эндемичные страны, а также увеличение объема экспорта животных создает реальную угрозу завоза возбудителя в благополучные по мелиоидозу государства, о чем свидетельствуют случаи выявления заболевания в Европе и Америке. Полиморфизм клинических проявлений при высокой летальности инфекции, отсутствие средств специфической профилактики и относительно узкий спектр чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам обуславливают проблемы, как в своевременной диагностике, так и в выборе наиболее эффективных схем лечения больных. В этой связи возрастает актуальность вопросов, связанных с совершенствованием методов лабораторной диагностики мелиоидоза.

Вьетнам относится к эндемичным по мелиоидозу странам с богатым опытом изучения экологии, микробиологии и иммунологии возбудителя. Более того, постоянное выделение природных и клинических штаммов *Burkholderia pseudomallei* создает экспериментальную базу для изучения изменчивости микроба и мониторинга основных диагностических признаков возбудителя. Вместе с тем, до настоящего времени лабораторная диагностика заболевания представляет определенные трудности, связанные с информативностью или эффективностью того или иного метода. Поэтому актуальность расширения арсенала диагностических приемов с использованием современных молекулярно-биологических методов не вызывает сомнения. Именно эти вопросам посвящена диссертационная работа Буй Тхи Лан Ань на тему «Характеристика штаммов *Burkholderia pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных на

территории Социалистической Республики Вьетнам, и совершенствование алгоритмов их идентификации».

Структура и объем диссертации

Работа выполнена в рамках совместной российско-вьетнамской НИР № государственной регистрации АААА-А18-118032790070-8, изложена на 126 стр. компьютерного текста, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 5 глав результатов собственного исследования с их обсуждением, заключение и выводы. Список литературы включает 122 источника, в том числе 6 - на русском языке и 116 - на английском. Диссертация содержит обширный фактический материал, представленный высококачественно оформленным иллюстративным материалом в виде 17 таблиц и 27 рисунков.

При проведении научных исследований и их оформлении соискатель показал умение ставить и решать поставленные задачи, глубоко анализировать полученные результаты.

Информативное введение содержит все рубрики, необходимые для описания актуальности выбранного соискателем научного направления.

Цель исследования четко сформулирована, а 6 задач направлены на реализацию поставленной цели.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна, теоретическая и практическая значимость

Высокая степень достоверности полученных результатов обеспечена анализом достаточного объема фактического материала, полученного с использованием современных научных методов.

Научная новизна работы заключается в том, что автору удалось впервые доказать, что морфотип колоний не является надежным диагностическим критерием, так как в процессе выполнения исследования обнаружены новые ранее не описанные типы колоний. Кроме того, выявлен новый признак (ферментация малоната), позволяющий биохимическим методом проводить дифференциацию близкородственных бульхордерий. Достаточно приоритетными представляются результаты по обнаружению новых недавно возникших сиквенс-типов, что свидетельствует о продолжающейся эволюции возбудителя мелиоидоза. Несомненна и практическая значимость работы: создана репрезентативная коллекция

штаммов *B. pseudomallei*, которая может быть полезна при разработке диагностических тест-систем, а также при изучении биологических особенностей штаммов, выделенных из различных источников. Нельзя не отметить и тот факт, что проведенный соискателем сравнительный анализ эффективности/достоверности/ чувствительности разных современных молекулярно-генетических методов показал предпочтительность ПЦР по сравнению с другими методами. Полученные автором результаты подтверждают гипотезу о том, что субрегион Мегонга является горячей точкой эволюции возбудителя мелиоидоза, которая продолжается в настоящее время.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе в целом

Несомненной положительной оценки заслуживает обзор литературы, в котором на основе анализа 122 отечественных и зарубежных источников представлено современное состояние вопросов, интересующих автора. Обзор отличается хорошим стилем изложения, глубиной анализа исследуемых вопросов и характеризуется четкостью и логичностью. Заслуживает уважения бережное отношение к историческим источникам цитирования.

Для решения поставленных задач автор использует широкий набор современных методов исследования – микробиологический, биохимический, иммунологический, молекулярно-биологический и биоинформационный.

В главе 3 собственных исследований для создания экспериментальной базы автор формирует репрезентативную коллекцию из охарактеризованных штаммов *B. pseudomallei* и близкородственных бульхордерий, выделенных из полевого и клинического материала в современный период 2015-2020 гг., что повышает ее ценность для проведения как ретроспективного (для сравнения с ранее изолированными культурами), так и оперативного мониторинга основных свойств возбудителя. Представляют практическое значение результаты по сравнительному изучению влияния пробоподготовки на эффективность выделения почвенных штаммов. Показано, что наиболее адекватным и наименее трудоемким является метод прямого культивирования проб почвы.

С использованием сформированной коллекции штаммов Буй Тхи Лан Ань проводит изучение эффективности нескольких (ПЦР, латекс-агглютинация, биохимическое профилирование) методов и убедительно доказывает, что наиболее информативным является ПЦР с применением оригинальных специфических праймеров.

Глава 4 посвящена анализу вариабельности фенотипических признаков вьетнамских штаммов, имеющих диагностическое значение. Полученные данные убедительно демонстрируют, что морфология колоний и резистентность к гентамицину не являются надежными критериями презумптивной идентификации возбудителя мелиоидоза.

Логическим продолжением изучения фенотипической вариабельности штаммов является глава 5, в которой приводятся результаты исследования генетического разнообразия вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза. На основании филогенетического анализа полногеномного и фрагментарного секвенирования коллекционных штаммов и имеющихся геномов в международной базе данных автору удалось составить филогенетическое дерево и показать разнообразие генетических типов *B. pseudomallei*, циркулирующих на территории Вьетнама. Безусловной заслугой автора является обнаружение недавно сформированных в экосистемах Вьетнама 6-ти новых сиквенс-типов. Учитывая тот факт, что *B. pseudomallei* относится ко II группе патогенности и включена в список опасных агентов биотерроризма, дальнейшее изучение этих новых штаммов представляет несомненный научный интерес для пополнения не только Вьетнамской национальной коллекции патогенных микроорганизмов, но и для пополнения коллекции штаммов РФ.

В главе 6 автором представлены приоритетные данные по изучению механизмов возникновения чувствительности к гентамицину у природно резистентных штаммов буркхольдерий. Известно, что формирование резистентности к гентамицину может быть обусловлено несколькими механизмами. Несмотря на сложность выяснения этих вопросов, соискателю удалось показать наличие разных мутаций в генах, ответственных за резистентность бактерий к гентамицину. Как оказалось, к снижению резистентности приводят мутации, снижающие эффективность эффлюкса антибиотика или ферментативную инактивацию препарата. Заслуживает особого уважения достаточно аккуратная и корректная интерпретация полученных результатов, когда автор оставляет альтернативу для их осмысления.

В главе 7 автором предложены лабораторные протоколы для генодиагностики возбудителя мелиоидоза с использованием ПЦР, LAMP и LF-RPA технологий. В процессе выполнения работы подобраны оригинальные специфические праймеры для детекции возбудителя как в электрофоретическом режиме ПЦР, так и в режиме Real-time. Показано также, что оптимизированный вариант LAMP обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может быть использован для

обнаружения ДНК бактерий в почве. Кроме того, соискателем установлено, что с помощью LF-RPA возможно выявление детекции ДНК из почвы без этапа выделения ДНК, что существенно упрощает процедуру мониторинга возбудителя в эндемичных очагах.

Заключение

Диссертацию завершает заключение, которое содержит анализ и обсуждение полученных результатов, и 8 обоснованных выводов. Следует особо подчеркнуть корректную интерпретацию полученных данных и предложения о перспективах дальнейших исследований в этом направлении.

Принципиальных замечаний к работе нет. В качестве пожелания хотелось бы рекомендовать автору следующее: имея в своем распоряжении столь представительную коллекцию штаммов буркхольдерий, изолированных из различных источников, интересным является вопрос об их патогенном потенциале.

В целом диссертация Буй Тхи Лан Ань на тему «Характеристика штаммов *Burkholderia pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных на территории Социалистической Республики Вьетнам, и совершенствование алгоритмов их идентификации» является законченным самостоятельным исследованием, в котором получены новые приоритетные данные по актуальной научной проблеме – совершенствованию методов лабораторной диагностики мелиоидоза. Диссертационная работа Буй Тхи Лан Ань имеет внутреннее единство, свидетельствует о творческой зрелости соискателя и его личном вкладе в науку. Основные положения, выдвинутые автором для публичной защиты, и выводы достаточно аргументированы и подтверждены фактическим материалом.

Материалы диссертации полностью отражены в автореферате и 16 опубликованных работах, из которых 2 – в изданиях, рекомендованных ВАК.

Считаю, что по актуальности темы, методическому уровню, объему и достоверности полученного фактического материала, его научной новизне, теоретической и практической значимости, работа Буй Тхи Лан Ань на тему «Характеристика штаммов *Burkholderia pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных на территории Социалистической Республики Вьетнам, и совершенствование алгоритмов их идентификации» соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, опубликованными в

Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор достоин присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент

Главный научный сотрудник лаборатории туляремии Федерального казенного учреждения 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 (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук



Наталья Владимировна Павлович

Адрес: 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
Телефон: 8 (863) 240-27-03
E-mail: plague@aanet.ru

Подпись Н.В.Павлович заверяю
Начальник отдела кадров
ФКУЗ «Ростовский-на-Дону
научно-исследовательский
противочумный институт»
Роспотребнадзора



Е.Е. Стоян

