

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

комиссии диссертационного совета 64.1.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора по докторской диссертации Захаровой Ирины Борисовны на тему: «Мелиоидоз – актуальные вопросы современной эволюции и разнообразия *Burkholderia pseudomallei* в аспектах совершенствования лабораторной диагностики», выполненной в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

**Соответствие соискателя ученой степени требованиям, необходимым для допуска к защите.** Захарова И.Б. соответствует требованиям, изложенным в п. 3 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г.: имеет степень кандидата биологических наук, подтвержденную дипломом КТ № 001391, ученое звание доцента по специальности «Микробиология» (Аттестат доцента ДС № 000816), выполнила диссертационную работу на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, давшего положительное заключение по данной диссертации.

**Соответствие диссертации специальности, по которой совету предоставлено право защиты.** Диссертация Захаровой И.Б. выполнена при консультировании доктора медицинских наук Топоркова Андрея Владимировича (специальность 3.2.2. Эпидемиология, медицинские науки) на современном научно-методическом уровне с использованием микробиологических, биохимических, биоинформатических и статистических методов исследования. Члены комиссии считают, что диссертация Захаровой И.Б. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», паспорту специальности 1.5.11. Микробиология по пунктам 1 – «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 2 – «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 6 – «Сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов».

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором. Выполнение требований к публикации основных научных результатов диссертации.** По теме диссертации опубликована 121 научная работа, в то числе 29 статей в журналах, входящих в базы данных международных индексов научного цитирования WoS, Scopus и в российских журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 4 учебно-методических работы, одна коллективная монография, 10 патентов на изобретения и одна база данных, что является вполне достаточным для проведения защиты.

Автор самостоятельно разработала концепцию исследования, определила алгоритмы и методологию выполнения работы, обобщила литературные данные по проблеме, провела аналитические, *in silico* и экспериментальные исследования, а также анализ и интерпретацию результатов. Отдельные этапы экспериментальных исследований и сбор полевого материала выполнены совместно с сотрудниками лаборатории патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра, СРВ, Ханой.

Присвоения авторства чужого научного труда (плагиата), результатом которого может быть нарушение авторско-правового и патентного законодательства, в данной диссертации не обнаружено.

Диссертационная работа изложена в виде монографии на 310 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: оглавление, введение, 5 глав, содержащих анализ мирового опыта по проблеме исследования и экспериментальные разделы, заключения, выводов и списка литературы, включающего 563 источника, в том числе 33 отечественных и 530 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 35 таблицами и 42 рисунками.

**Актуальность** выбранной темы определяется тем, что мелиоидоз является трудной как для клинической, так и лабораторной диагностики особо опасной инфекцией. В связи с высокой вирулентностью, низкой инфицирующей дозой возбудитель мелиоидоза относится ко второй группе патогенных для человека микроорганизмов и категории «В» потенциальных средств биотерроризма. Значительная сложность идентификации *B. pseudomallei* и его дифференциации с филогенетически близкими видами комплексов *B. pseudomallei*, *B. serapia* и рядом других грамотрицательных неферментирующих бактерий обусловлена биологическими особенностями возбудителя. *B. pseudomallei* – по своей природе сапрофит, способный вызывать инфекцию у разных классов позвоночных животных и мелиоидоз – у человека. Благодаря внушительному набору факторов

патогенности *B. pseudomallei* успешно персистирует в различных типах клеток-хозяев и во внеклеточном пространстве, а также может манипулировать сигнальными путями хозяина для уклонения от его иммунного ответа.

Способность *B. pseudomallei* при различного рода стрессах переходить в жизнеспособное, но некультивируемое состояние нередко делают патоген невыявляемым методами классической бактериологии. Необычная для грамотрицательных бактерий и весьма разнообразная форма колоний затрудняют распознавание патогена при исследовании нестерильного в норме материала. Широкий диапазон внутривидовой вариабельности целого ряда биохимических признаков и высокий уровень сходства с оппортунистическими буркхольдериями являются причиной ошибок идентификации *B. pseudomallei* коммерческими биохимическими анализаторами. Существует потребность в расширении имеющихся баз данных дополнительными эталонными спектрами для масс-спектрометрического профилирования. Высокая частота рекомбинации и геномная гетерогенность штаммов не исключают вероятности получения ложных результатов при идентификации возбудителя мелиоидоза методом ПЦР, что свидетельствует о необходимости поиска альтернативных генодиагностических мишеней.

Ранняя диагностика мелиоидоза и начало специфического лечения в значительной степени определяют прогноз заболевания и неверный или отсроченный диагноз могут иметь тяжелые последствия, так как большинство антибиотиков, обычно используемых для лечения септицемии, неэффективны против *B. pseudomallei*. В этой связи разработка новых инструментов для быстрой и точной идентификации возбудителя мелиоидоза остается актуальной.

**Цель работы** – Совершенствование методических подходов лабораторной диагностики мелиоидоза и дифференциации *B. pseudomallei* от филогенетически близких видов патогенных буркхольдерий на основании комплексного анализа современных представлений о геномике, биологических свойствах, экологии возбудителя и актуальных вопросов эпидемиологии мелиоидоза.

**Научная новизна полученных результатов** заключается в том, что впервые проведена оценка генетического разнообразия штаммов *B. pseudomallei* на территории Вьетнама с использованием анализа аллельного полиморфизма по схеме мультилокусного сиквенс-типирования, а также полногеномных последовательностей. Показано неслучайное распределение штаммов по биогеографическим нишам и разделение вьетнамской популяции *B. pseudomallei* на отдельные субпопуляции, имеющие территориальную приуроченность.

Впервые получены экспериментальные доказательства способности возбудителя мелиоидоза длительное время выживать при температурах около 0 °С, а также при воздействии отрицательных температур как в постоянном режиме, так и в условиях неоднократного замораживания и оттаивания. Полученные данные подтверждают гипотезу, что возбудитель мелиоидоза не является исключительно тропическим обитателем и свидетельствуют о потенциально более широком естественном ареале *B. pseudomallei*.

На основании ретроспективного анализа нуклеотидных последовательностей семи консервативных генов, входящих в схему MLST, впервые показано различное происхождение штаммов *B. pseudomallei*, выделенных во Франции от животных и из внешней среды в период активной эпизоотии мелиоидоза (1976–1978 гг.).

Проведенный анализ заносных случаев мелиоидоза в неэндемичные страны позволил впервые показать отсутствие статистически достоверного влияния возраста ( $t = 0,36, p = 0,7458$ ) и предрасполагающих заболеваний ( $t = 1,24, p = 0,3040$ ) на риск развития мелиоидоза у посетителей эндемичных территорий, в отличие от коренного населения.

Установлено, что вариабельная часть видового пангенома *B. thailandensis* содержит более широкий, чем считалось ранее, набор ответственных за патогенность детерминант с высоким уровнем гомологии белковых продуктов с ортологами *B. pseudomallei*.

Впервые определены комплексы ключевых признаков, влияющие на корректность определения автоматическим анализатором Vitek 2 видовой принадлежности штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* с атипичными профилями биохимической активности: определяющие низкую дискриминацию между видами *B. pseudomallei* и *B. ceracia*, *B. mallei* и *B. ceracia* и ошибочную идентификацию возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

Впервые сформированы масс-спектры общеяклеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei*, включенные в электронные базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.<sup>™</sup> и MALDI Biotyper.

Впервые показана возможность использования генов β-лактамаз молекулярных классов В и D в качестве генетических мишеней для идентификации и дифференциации *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*. Установлено, что бактерии перечисленных видов отличаются по наборам генов β-лактамаз молекулярных классов В и D, выбранные гены имеют хромосомную локализацию, присутствуют у всех штаммов в соответствии с видовым репертуаром, являются консервативными, стабильно сохраняются в неселективных условиях в течение длительного времени, что определяет их пригодность для использования в качестве генодиагностических мишеней.

