

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 граммотрицательных 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 варибельности 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 варибельная 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.[™] 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.

Сконструированы и запатентованы: набор праймеров, детектирующих β-лактамазы буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» молекулярных классов А, В и D, относящихся к суперсемействам β-лактамазы/транспептидазы и металло-гидролазы/оксидоредуктазы; два набора праймеров для амплификации высокоиммуногенных мембранных протеинов *B. pseudomallei* с целью получения рекомбинантных антигенов; набор олигонуклеотидных праймеров для выявления вариантных штаммов *B. thailandensis*, содержащих высоко гомологичный *B. pseudomallei* кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида.

Приоритетность проведенных исследований подтверждена 10 патентами (RU 2280688 C1, RU 2413763 C1, RU 2458117 C1, RU 2458140 C1, RU 2474614 C1, RU 2608505 C, RU 2608506 C, RU 2728356 C1, RU 2662957 C2, RU 2662958 C2).

На основании анализа поступившей работы комиссия пришла к заключению о возможности защиты докторской диссертации Захаровой Ирины Борисовны на тему: «Мелиоидоз – актуальные вопросы современной эволюции и разнообразия *Burkholderia pseudomallei* в аспектах совершенствования лабораторной диагностики» в диссертационном совете 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ.

Члены комиссии:

доктор вет. наук, проф. Светоч Эдуард Арсеньевич (председатель)

(подпись)

доктор биол. наук Павлов Виталий Михайлович

(подпись)

доктор биол. наук Потапов Василий Дмитриевич

(подпись)

Председатель диссертационного совета
64.1.002.01 академик РАН, д-р мед. наук, проф.

Дятлов И.А.

Ученый секретарь диссертационного
совета 64.1.002.01, канд. биол. наук

Фурсова Н.К.

