

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ Волгоградский

научно-исследовательский

противочумный институт

Роспотребнадзора,

доктор медицинских наук, доцент

А. В. Топорков

2022 г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального казенного учреждения здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Диссертация Захаровой Ирины Борисовны «Мелиоидоз – актуальные вопросы современной эволюции и разнообразия *Burkholderia pseudomallei* в аспектах совершенствования лабораторной диагностики», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, 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.

В период подготовки диссертации соискатель Захарова Ирина Борисовна работала в Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте Роспотребнадзора. В 1985 г. окончила Саратовский Государственный Университет по специальности «биология» (Диплом с отличием Г-І №462895). В 1999 г. Захаровой И.Б. присуждена ученая степень кандидата биологических наук (Диплом КТ № 001391), в 2004 г. присвоено ученое звание доцента по специальности «Микробиология» (Аттестат доцента ДС № 000816).

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора «01» марта 2018 г. (протокол № 2) и откорректирована «19» ноября 2020 г. (протокол № 4).

Научный консультант – Топорков Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, директор Федерального казенного учреждения здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Захаровой Ирины Борисовны является завершённой научно-квалификационной работой, имеющей теоретическое и практическое значение, в которой получены новые данные, свидетельствующие о ведущей роли гомологичной рекомбинации в процессах адаптивной эволюции возбудителя мелиоидоза, что выражается в формировании новых сиквенс-типов (ST), являющихся одно- и двух-локусными вариантами ранее обнаруженных ST. Проведено теоретическое обоснование принадлежности вида *B. thailandensis* к оппортунистическим патогенам при наличии экспериментально подтвержденных межштаммовых отличий в вирулентности. На основании полученных данных о толерантности *B. pseudomallei* к длительному воздействию низких температур, включая отрицательные, высказана гипотеза, что область экологической пригодности для сохранения возбудителя в природе гораздо шире, чем прогнозировалось ранее, и существует потенциальная возможность интродукции возбудителя на ряде территорий Российской Федерации. Теоретически обоснованы технологические решения, позволяющие существенно повысить эффективность средств идентификации видов комплекса «*B. pseudomallei*» и их дифференциации с филогенетически

близкими бактериями рода *Burkholderia*. Проведен сравнительный анализ характеристик коммерческих биохимических анализаторов в аспекте их пригодности для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа. Охарактеризованы особенности биохимических профилей атипичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, статистически достоверно определяющие их некорректную идентификацию автоматическими анализаторами как *B. ceracia*. Осуществлена оптимизация протокола времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации буркхольдерий II группы патогенности, что обеспечивает эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности. Определены новые генодиагностические мишени, позволяющие в формате мультиплексной ПЦР идентифицировать *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*. Результаты проведенного исследования позволяют теоретически обосновать степень информативности каждого из методов лабораторной диагностики мелиоидоза и их вклад в установление диагноза.

Работа соответствует всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям. По комплексу методических подходов и исследованных проблем диссертационная работа Захаровой И.Б. соответствует отрасли науки «Биологические науки» и паспорту специальности 1.5.11 – «Микробиология» в областях исследований 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».

Диссертация выполнена в рамках 12 государственных тем: 029-3-04 (№ гос. регистрации 01200407957), 034-5-04 (№ гос. регистрации 01200407962),

046-3-07 (№ гос. регистрации 01200707220), 055-1-11 (№ гос. регистрации 01201155412), 071-7.4-11 (№ гос. регистрации 01201168591), 052-1-14 (№ гос. регистрации 01201376018), 059-3-11 (№ гос. регистрации 01201155410), 061-3-11 (№ гос. регистрации 01201155414), 081-3-13 (№ гос. регистрации 01201351985), 086-2-16 (№ гос. регистрации АААА-А17-117022850059-6), 090-3-17 (№ гос. регистрации АААА-А17-117022850054-1) и № гос. регистрации АААА-А18-118032790070-8, в трех из которых автор был ответственным исполнителем, в трех – руководителем.

Непосредственно автором разработана концепция исследования, определены алгоритмы и методология выполнения работы, обобщены литературные данные по проблеме, проведены аналитические и *in silico* исследования, а также анализ и интерпретация результатов экспериментальных исследований.

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), работавших под руководством автора настоящей работы. Секвенирование нуклеотидных последовательностей и MALDI-ToF масс-спектрометрия проведены совместно с сотрудниками секторов биоинформационного и протеомного анализа ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках выполнения государственных НИР. Сканирующая электронная микроскопия была выполнена при технической поддержке сотрудников ООО "ТЕСКАН". Формирование референтных белковых профилей масс-спектров *B. pseudomallei* и *B. mallei* для базы данных MALDI Biotyper проведено совместно со специалистами ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Достоверность полученных результатов основана на анализе значительного объема литературных данных и фактического материала, полученного с использованием современных методов исследования. Научные положения и выводы теоретически обоснованы и базируются на полученных в ходе работы данных. Выводы вытекают из существа проделанной экспериментальной работы и соответствуют поставленным целям и задачам. Основные положения, изложенные в настоящей работе, опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах и прошли экспертную оценку.

Научная новизна проведенных исследований состоит в том, что представлены новые данные о генетическом разнообразии и разделении вьетнамской популяции *B. pseudomallei* на отдельные территориально приуроченные субпопуляции; получены экспериментальные доказательства способности возбудителя мелиоидоза длительное время выживать при низких температурах; показано различное происхождение штаммов *B. pseudomallei*, выделенных во Франции от животных и из внешней среды в период активной эпизоотии мелиоидоза (1976–1978 гг.); установлено 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; 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*; сформированы масс-спектры общеклеточных 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; показана возможность использования генов  $\beta$ -лактамаз молекулярных классов В и D в качестве генетических

мишеней для идентификации и дифференциации *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*.

Сконструированы и запатентованы: набор праймеров, детектирующих  $\beta$ -лактамазы буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» молекулярных классов А, В и D, относящихся к суперсемействам  $\beta$ -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 ).

Практическая значимость исследования. Аналитические и экспериментальные данные, полученные при выполнении диссертационной работы, послужили основой проекта методических указаний «Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа. Организация и проведение в лабораториях различного уровня», представлены в практическом руководстве «Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*» (Волгоград, 2018), а также были использованы в проекте Методических Указаний «Порядок молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе референс-центров и национальных центров верификации диагностической деятельности» и методических рекомендациях МР 3.1.0129-18 «Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неустановленного систематического положения», утвержденных Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека - Главным государственным

санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 31 мая 2018 г. (федеральный уровень внедрения).

Полученные в настоящей работе данные биохимического профилирования штаммов *Burkholderia* spp. и профили генов  $\beta$ -лактамаз молекулярных классов А, В и D внесены в паспорта штаммов коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (учрежденческий уровень внедрения).

Разработан раздел референтных MALDI TOF спектров типичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* электронной базы данных S.A.R.A.M.I.S.<sup>TM</sup>, который также размещен в единой базе данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper», зарегистрированной Федеральной службой по интеллектуальной собственности (номер регистрации в Реестре баз данных 2016620345 от 15.03.2016) (федеральный уровень внедрения).

Зарегистрирован в установленном порядке разработанный «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*»  $\beta$ L B/D - EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7785 от 07.11.2018 г.) (федеральный уровень внедрения).

Аннотированы и депонированы в GenBank NCBI нуклеотидные последовательности генов  $\beta$ -лактамаз молекулярных классов В и D: суперсемейства «металло-гидролазы / оксидоредуктазы» семейств  $\beta$ -CASP РНК-метаболизующие гидролазы (KU053951, KU053952, KU053953, KU053954, KU053955) и глиоксалазы II (KU165828, KU165829, KU165830, KU165831, KU165832, KU165833), суперсемейства  $\beta$ -лактамазы/транспептидазы, семейства  $\beta$ -лактамазы/D-ala карбоксипептидазы (оксациллиназы) (MG384618, MG384619, MG384620, MG384621, MG384622, MG384623) штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* дикого типа

и их полирезистентных производных. Депонированы в GenBank NCBI последовательности шотган полногеномных сиквенсов двух пар изогенных штаммов *B. pseudomallei*, отличающихся по чувствительности к цефтазидиму и имипенему (QLUY000000000.1, QLVB000000000.1, QLUX000000000.1, QLVA000000000.1), а также штаммов дикого типа *B. pseudomallei* (QLVC000000000.1, PHRB000000000.1, PHRC000000000.1, WTLF000000000.1, WSRT000000000.1, WSRV000000000.1, WSRU000000000.1, WSPI000000000.1, WUMQ000000000.1, WTLF000000000.1, WOWY000000000.1), *B. ceracia* (QLUZ000000000.1), *B. thailandensis* (PHRD000000000.1, WOXA000000000.1, WOWZ000000000.1) (международный уровень внедрения).

В Государственной Коллекции Патогенных Бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ «М») депонированы полирезистентные варианты и инсерционные мутанты со сниженным уровнем устойчивости к  $\beta$ -лактамам штаммов *Burkholderia* spp. под номерами КМ 195, КМ 196, КМ 197, КМ 30 и КМ 32. В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы охарактеризованные типичные штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* дикого типа (справки о депонировании №№ 360–363 от 23.03.2012 г.) (федеральный уровень внедрения).

Материалы анализа мирового опыта лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа, а также практические рекомендации, сделанные на основании проведенных исследований, включены в лекционные курсы дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (учрежденческий уровень внедрения).

Разработанные в настоящей работе методические приемы, алгоритмы анализа и генодиагностический набор реагентов используются в деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, а также для идентификации

клинических и почвенных изолятов на эндемичной по мелиоидозу территории Социалистической Республики Вьетнам в лаборатории молекулярной биологии Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой) и вошли в практическое руководство «Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*» Под редакцией А. В. Топоркова, А. Н. Кузнецова, Х. Зы Нгуен. – Волгоград: Волга-Пресс, 2018. – 96 с., изданного на русском и вьетнамском языках (международный уровень внедрения).

Основные результаты исследований изложены в 121 опубликованной работе, из них 25 – в рецензируемых периодических изданиях, входящих в перечень ВАК; 4 – в зарубежных журналах, индексируемых WoSCC, WoS и SCOPUS; а также в 4 учебно-методических работах, одной коллективной монографии, 10 патентах на изобретения и вошли в одну базу данных.

Диссертационная работа Захаровой Ирины Борисовны «Мелиоидоз – актуальные вопросы современной эволюции и разнообразия *Burkholderia pseudomallei* в аспектах совершенствования лабораторной диагностики» имеет завершенный характер, поставленная цель достигнута, задачи выполнены, новизна и практическая значимость подтверждены. Диссертация рекомендуется для представления к защите на соискание ученой степени доктор биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Заключение принято на заседании межлабораторной научной конференции специалистов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Присутствовало на заседании – 50 человек.

Результаты голосования: «за» – 50;

«против» – нет;

«воздержалось» – нет.

Протокол № 4 от «24» декабря 2019 г.

Председатель заседания

кандидат медицинских наук,

ведущий научный сотрудник

лаборатории иммунодиагностических препаратов



Новицкая

Ирина Вячеславовна

Секретарь заседания

научный сотрудник лаборатории

патогенных буркхольдерий



Кузютина

Юлия Александровна

Подписи Новицкой И.И., Кузютиной Ю.А.

заверяю: начальник отдела делопроизводства

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский

противочумный институт Роспотребнадзора



Чернова

Елена Александровна