

ОТЗЫВ

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

Актуальность диссертационной работы

Мелиоидоз – тяжелое инфекционное заболевание с высокой летальностью, требующее длительной (до 6 месяцев) антибактериальной терапии, этиологическим агентом является *Burkholderia pseudomallei*. Дифференциация между мелиоидозом и другими инфекционными заболеваниями затруднена и часто по клиническим симптомам объективно - невозможна. Заболевшим мелиоидозом нередко диагностируют вирусные лихорадки, туберкулез, онкологические и другие заболевания.

Возбудитель мелиоидоза является по своей природе сапрофитом, однако патогенен для широкого круга хозяев и способен вызывать инфекционный процесс, практически, у всех классов позвоночных животных, в том числе домашних и сельскохозяйственных. Идентификация осложнена из-за высокого фенотипического, биохимического (ферментативного), а в ряде случаев антигенного и генетического сходства с филогенетически близкими видами комплексов «*B. pseudomallei*», «*B. cepacia*» и рядом других грамотрицательных неферментирующих бактерий.

В связи с высокой вирулентностью для человека, низкой инфицирующей дозой, бактерии *B. pseudomallei* относят ко второй группе патогенных для человека микроорганизмов, а также они входят в категорию «В» потенциальных средств биотерроризма.

Исследования последних лет выявили широкую циркуляцию возбудителя на всех континентах в тропических и субтропических регионах и рост регистрируемой заболеваемости в глобальном масштабе, и как следствие

этого процесса - увеличение числа завозных случаев мелиоидоза во многие страны с умеренным климатом.

Ранняя диагностика мелиоидоза и назначение адекватной терапии в значительной степени определяют прогноз заболевания. Поздняя диагностика и позднее назначение специфической терапии могут иметь тяжелые последствия, так как антимикробные препараты, обычно используемые для лечения септицемий, неэффективны в отношении штаммов *B. pseudomallei*.

Все выше сказанное определяет актуальность диссертационной работы Захаровой Ирины Борисовны, посвященной комплексному анализу и совершенствованию средств лабораторной диагностики мелиоидоза.

Цель и задачи представленной работы отвечают запросам современной микробиологической науки и касаются приоритетных направлений развития науки и технологий в Российской Федерации «Науки о жизни» и «Технологии предупреждения и ликвидации чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера».

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена современными теоретическими положениями, основанными на глубоком анализе научной литературы (отечественной и зарубежной), определяется логически выстроенным планом диссертационного исследования.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечивается значительным объемом новых данных, полученных с использованием классических и современных методов исследования, адекватных поставленным задачам, их соответствием поставленной цели, статистической обработкой полученных результатов. Выводы проведенных исследований экспериментально обоснованы и полностью отражают цель и задачи диссертационного исследования.

Основные положения, изложенные в диссертационной работе, прошли экспертную оценку и опубликованы в рецензируемых периодических

изданиях, входящих в перечень ВАК (25), – в зарубежных журналах, индексируемых WoSCC, WoS и SCOPUS (4) а также в учебно-методических работах (4), одной монографии (коллективной), патентах на изобретения (10) и зарегистрированной базе данных.

Полученные в процессе выполнения диссертационной работы научные результаты прошли широкую апробацию – представлены на 26-ти Всероссийских и международных научных и научно-практических форумах, включая конгрессы «Vaccine & Immunization» (Manchester, 1999), «The 4th World Melioidosis Congress (WMC)» (Perth, Australia, 2001), «The 6th WMC» (Khon Kaen, Thailand, 2007) и «The 9th WMC» (Hanoi, Vietnam, 2019).

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна результатов, выводов и рекомендаций диссертационной работы Захаровой Ирины Борисовны определяется тем, что впервые установлена неоднородность вьетнамской популяции *B. pseudomallei* и выделение отдельных субпопуляций в соответствии с территориальной циркуляцией возбудителя.

Впервые показано различное происхождение штаммов *B. pseudomallei*, выделенных во Франции от животных и из внешней среды в период активной эпизоотии мелиоидоза (1976–1978 гг.), что имеет существенное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение в теории и практике целенаправленной борьбы и профилактики мелиоидоза.

Выявлены статистически значимые отличия в возрастной структуре заболевших и предрасполагающих сопутствующих заболеваний на риск развития мелиоидоза у «посетителей» и коренного населения эндемичных территорий. Установлено, что масштаб расхождения по факторам патогенности между *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* на уровне видовых пангеномов значительно ниже, чем считалось ранее.

Доказана возможность использования генов β -лактамаз молекулярных классов В и D (кодирующих резистентность к клинически значимым антимикробным препаратам) в качестве генетических мишеней для идентификации трех видов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*, что имеет важное значение в повышении качества лабораторных исследований в медицинской микробиологии и бактериологии, и, безусловно, скажется на качестве оказания медицинской помощи населению, а также при проведении микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за мелиоидозом и сапом.

Диссертантом проведена оценка диагностической эффективности каждого из методов лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа и их вклада в установление диагноза.

В процессе выполнения работы диссертантом получены 10 патентов на изобретения (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).

Теоретическая значимость работы

Диссертантом экспериментально подтверждена гипотеза о неслучайном распределении штаммов *B. pseudomallei* по различным экологическим нишам. На основании филогенетического анализа данных мультилокусного сиквенс-типирования штаммов вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза показано, что современная микроэволюция *B. pseudomallei* обусловлена адаптацией к конкретному экологическому окружению и свидетельствует о ведущей роли гомологичной рекомбинации в процессах адаптивной эволюции возбудителя, что выражается в формировании новых сиквенс-типов. Теоретически обоснована принадлежность вида *B. thailandensis* к оппортунистическим патогенам и наличие экспериментально подтвержденных межштаммовых различий в вирулентности. На основании полученных данных о толерантности штаммов *B. pseudomallei* к воздействию

низких температур диссертантом высказана гипотеза о том, что область экологической пригодности для сохранения возбудителя в природе шире, чем прогнозировалось ранее, и существует потенциальная возможность интродукции возбудителя на ряде территорий Российской Федерации. Теоретически обоснованы технологические решения, позволяющие повысить эффективность средств идентификации видов комплекса «*B. pseudomallei*» и их дифференциации с бактериями рода *Burkholderia*. Результаты диссертационного исследования позволяют теоретически обосновать степень информативности каждого из методов лабораторной диагностики мелиоидоза и их вклад в установление диагноза.

Практическая значимость работы

Диссертационная работа Захаровой Ирины Борисовны имеет большое теоретические и практическое значение: полученные при выполнении работы аналитические и экспериментальные данные 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).

Разработаны и зарегистрированы: раздел референтных MALDI TOF спектров обще клеточных белков типичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper (номер регистрации в Реестре баз данных 2016620345 от 15.03.2016) (федеральный уровень внедрения); «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» β 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). Определены комплексы ключевых признаков, влияющие на корректность автоматической биохимической идентификации атипичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* (учрежденческий уровень внедрения).

Аннотированы и депонированы в GenBank NCBI 17 нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз молекулярных классов В и D штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* дикого типа и их полирезистентных производных; 15 шотган-полногеномных сиквенсов штаммов возбудителя мелиоидоза, 3 – *B. thailandensis* и один – *B. ceracia* (международный уровень внедрения). В Государственных Коллекциях депонированы 4 типичных и 5 мутантных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* (федеральный уровень внедрения).

Структура и содержание диссертации

Диссертация Захаровой Ирины Борисовой изложена на 310 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 35 таблицами и 42 рисунками. Работа выполнена в форме монографии и состоит из введения, 5 глав, содержащих анализ мирового опыта по проблеме исследования и экспериментальные разделы собственных исследований, заключения, выводов и списка

литературы, включающего 563 источника, в том числе 33 на русском и 530 на английском языках.

Введение содержит все разделы, регламентированные пунктом 5.3.1 ГОСТ Р 7.0.11 – 2011, в которых сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и защищаемые положения.

В первой главе автор провела анализ проблем таксономии обширного рода *Burkholderia* в целом, сделав акцент на клинически значимых видах, сгруппированных в комплексы «*Burkholderia cepacia*» и «*Burkholderia pseudomallei*», и продемонстрировала обилие филогенетически близких возбудителю мелиоидоза видов, занимающих те же экологические ниши и обладающих сходными фенотипическими признаками, а также генетическое разнообразие глобальной популяции *B. pseudomallei*. Тем самым подведена теоретическая база для собственных исследований, результаты которых изложены в данной главе. Описанный в разделе 1.4.2 филогенетический анализ данных мультилокусного сиквенс типирования по классической схеме (MLST) и локусов основного генома (cgMLST) штаммов вьетнамской популяции *B. pseudomallei* показал циркуляцию на территории Вьетнама отдельных территориально приуроченных субпопуляций возбудителя, что подтверждает ранее высказанную гипотезу о случайном распределении штаммов по биогеографическим нишам. Кроме того, полученные данные свидетельствуют, что использование алгоритма молекулярного типирования с высокой дифференцирующей способностью позволяет точно определять характер клональности возбудителя при регистрации мелиоидоза и регион происхождения штаммов возбудителя, что имеет существенное прикладное эпидемиологическое и экологическое значение.

Важное место в главе занимает раздел собственных биоинформатических исследований автора, касающихся дивергенции между *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* по факторам вирулентности. Результаты проведенного анализа показали, что штаммы *B. thailandensis* отличаются по

набору ответственных за патогенность детерминант, уровень гомологии которых с ортологами *B. pseudomallei* значительно превышает средний по протеому, и, соответственно, разные штаммы возбудителей характеризуются разным уровнем вирулентности, что нашло свое подтверждение в проведенных экспериментальных исследованиях. Это позволило автору прийти к обоснованному заключению, что штаммы вида *B. thailandensis* содержат гены, кодирующие факторы патогенности, и в настоящее время нельзя продолжать считать эти микроорганизмы непатогенным.

В главе 2 рассматриваются ключевые вопросы современной эпидемиологии мелиоидоза, вопросы глобального распространения инфекции, связанные с расширением ареала возбудителя и увеличением числа случаев завоза инфекции в страны умеренного климата. Приведены данные, отражающие тенденцию увеличения уровня заболеваемости мелиоидозом в эндемичных регионах; отмечены основные факторы, влияющие на рост заболеваемости. В этой главе также обсуждаются вопросы возможной выживаемости *B. pseudomallei* за пределами традиционных эндемичных регионов, определяющейся выраженным потенциалом сохранения микроорганизма в экстремальных условиях. Заслуживает внимания проведенный автором филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей штаммов, выделенных от животных, объектов внешней среды (из почвы и воды) в период активной эпизоотии мелиоидоза во Франции в 1976-78 годах. Ирина Борисовна показала, что вспышка (очаг мелиоидоза) носила неклональный характер из чего следует неоднократность случаев заноса возбудителя. Логическим продолжением этого направления явились экспериментальные исследования, в которых была изучена устойчивость штаммов *B. pseudomallei* к низким, в том числе отрицательным, температурам. Приведены интересные результаты наблюдений за снижением численности микроорганизма в различных условиях понижения температуры, включая чередование циклов замораживания-оттаивания. Полученные экспериментальные доказательства возможности выживания *B. pseudomallei* в

условиях длительного воздействия низких температур объясняют длительное выживание возбудителя мелиоидоза в зонах умеренного климата и свидетельствуют о его возможно более широком естественном ареале, выходящем за установленные в настоящее время границы.

Кроме того, автором определены тенденции в многолетней динамике заноса мелиоидоза в неэндемичные страны и проведен анализ особенностей влияния предрасполагающих факторов на риск развития мелиоидоза у посетителей эндемичных регионов в сравнении с коренными жителями.

В главе 3 диссертант проанализировала состояние технологий, обеспечивающих выявление и идентификацию возбудителей мелиоидоза и сапа, обоснована необходимость поиска новых решений при разработке методов и средств их быстрой и достоверной детекции.

Автором систематизированы особенности морфологических вариантов колоний *B. pseudomallei* на среде Эшдауна и предложена оригинальная классификация в лучших традициях отечественной микробиологии, отражающей морфологические особенности колоний *B. pseudomallei*.

Значительная часть главы касается оценки применения для идентификации штаммов комплекса «*pseudomallei*», используя автоматические биохимические анализаторы. Проведен анализ эффективности использования ряда известных систем. С использованием системы Vitek 2 GN автором исследованы биохимические особенности коллекционных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа. Анализ результатов позволил с высокой статистической достоверностью выявить комплексы биохимических признаков, влияющих на корректность идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа.

В главе также представлены материалы по адаптации протокола пробоподготовки для профилирования общеклеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei* методом масс-спектрометрии, обеспечивающего эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности.

Сформированы идентификационные масс-спектры патогенных видов *Burkholderia* и разработан оригинальный раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров.

В четвертой главе проведен тщательный анализ опубликованных данных о диагностической эффективности иммунологических методов при мелиоидозе, полученных в эндемичных регионах на репрезентативных выборках пациентов, который убедительно показал, что результаты серологической диагностики мелиоидоза не являются однозначными и не могут являться основным критерием для установления диагноза.

Завершает диссертационную работу глава 5, в которой рассмотрены существующие в настоящее время способы идентификации видов комплекса «*B. pseudomallei*» молекулярно-генетическими методами, их достоинства и ограничения. Большая часть главы посвящена исследованию потенциала генов β -лактамаз классов А, В и D для использования в качестве диагностических мишеней. Автором показано, что виды комплекса «*B. pseudomallei*» различаются по набору генов β -лактамаз молекулярных классов В и D. Выбранные генетические мишени имеют широкую распространенность среди штаммов этих видов, входят в состав структурно стабильных областей основного генома, имеют консервативную нуклеотидную последовательность и стабильно наследуются без селективного давления в течение длительного времени. Ирина Борисовна делает обоснованный вывод о возможности их использования в качестве диагностических генетических мишеней.

Исследования в этом направлении получили логическое развитие прикладного характера – создан и запатентован набор праймеров, на основании которых разработан и зарегистрирован в установленном порядке набор реагентов, идентифицирующий с высокой эффективностью штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* различного географического происхождения, независимо от срока давности и источника выделения микроорганизма, а также штаммы перечисленных видов с измененным уровнем резистентности к β -лактамным препаратам.

Следует отметить, что комплексный характер проведенного исследования позволил Захаровой И.Б. внести существенные дополнения к регламентированным критериям выдачи результатов лабораторной диагностики мелиоидоза.

Принципиальных замечаний выполненная диссертационная работа не вызывает. В процессе ознакомления с диссертацией возникли в плане дискуссии следующие вопросы:

1. Комплексы биохимических (ферментативных) признаков, влияющих на корректность идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа автоматическими анализаторами, были выявлены при анализе коллекционных штаммов, длительно хранившихся в искусственных условиях. Проявляется ли это закономерностью у свежевыделенных штаммов?

2. Как вы считаете, чем обусловлены отличия во влиянии предрасполагающих факторов на риск развития мелиоидоза у коренных жителей и посетителей эндемичных регионов?

3. Поясните, пожалуйста, связь между уникальностью сиквенс-типов штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенных во Франции в период эпизоотии, и сроком давности их заноса на территорию страны.

4. Чем обусловлено отсутствие сероконверсии при мелиоидозе – особенностями иммунного статуса заболевших или же свойствами штаммов возбудителя или особенностями используемых тест-систем?

Объем проделанной работы, высокий методический уровень исследований, наглядное представление полученных данных и их разностороннее обсуждение являются показателем научной зрелости соискателя.

Выводы научно обоснованы, подтверждены достоверными результатами, являются логическим завершением исследования, полностью соответствуют поставленным задачам и отражают сущность работы.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011. Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 1.5.11. Микробиология и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Захаровой Ирины Борисовны на тему «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, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения, новые технологические решения и средства, значительно повышающие эффективность лабораторной диагностики мелиоидоза. Совокупность результатов следует квалифицировать как существенное достижение в совершенствовании системы мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации от заноса (завоза) и распространения мелиоидоза среди населения на территории России, имеющие важное значение для медицинской микробиологии и бактериологии.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему и методическому уровню проведенных исследований, репрезентативности фактического материала диссертационная работа Захаровой Ирины Борисовны полностью 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, от

20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, предъявляемым ВАК РФ к докторским диссертациям, а ее автор Захарова Ирина Борисовна заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией кишечных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

доктор медицинских наук

Кафтырева Лидия Алексеевна

Подпись Л.А. Кафтыревой заверяю:

Ученый секретарь ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: 8 (812) 233-20-92, email: pasteur@pasteurorg.ru)

кандидат медицинских наук

Трифонова Галина Федоровна

15 августа 2022 г.

