

ОТЗЫВ

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

Актуальность диссертационного исследования

Серьёзность проблемы мелиоидоза определяется свойствами его возбудителя *Burkholderia pseudomallei*, характеризующимися высокой вирулентностью, низкой инфицирующей дозой, возможностью аэрогенного пути их передачи восприимчивому организму, частым тяжёлым клиническим течением заболевания и летальными исходами болезни, а также наличием его активных природных очагов в регионе влажных субтропиков и непредсказуемыми последствиями завоза возбудителя в страны с умеренным климатом. Практически во всех странах Западной Европы за последние годы зарегистрированы случаи мелиоидоза среди лиц, побывавших в качестве туристов или специалистов в эндемичных зонах.

Клиническая диагностика мелиоидоза сложна в связи с полиморфностью течения заболевания, дифференциация между мелиоидозом и другими острыми и хроническими бактериальными инфекциями в неэндемичных регионах практически невозможна. Способность *Burkholderia pseudomallei* выживать и размножаться в клетках млекопитающих, в том числе в фагоцитирующих, определяет высокую частоту рецидивов болезни спустя месяцы или даже годы после успешного курса лечения. Прогноз заболевания определяют ранняя диагностика мелиоидоза и своевременность лечения. Однако выявление *B. pseudomallei* существующими методами специфической диагностики (бактериологическим, биохимическим, масс-спектрометрическим) малоэффективны или зачастую невозможны. Преимущественно для идентификации возбудителя мелиоидоза в настоящее время используется полимеразная цепная реакция, но высокая частота рекомбинации и геномная гетерогенность штаммов не исключают вероятности получения ложных результатов.

Актуальность направления исследования – совершенствование методов лабораторной диагностики мелиоидоза, расширение арсенала диагностических

приёмов с использованием современных молекулярно-биологических методов, позволяющих быстро и точно идентифицировать *B. pseudomallei*, надёжно дифференцировать их от других видов буркхольдерий, не вызывает сомнения.

Научная новизна и практическая значимость исследований

Автором впервые показано генетическое разнообразие штаммов *B. pseudomallei* на территории Вьетнама на основе анализа аллельного полиморфизма по схеме мультилокусного сиквенс-типирования, а также полногеномных последовательностей. Установлено неслучайное распределение штаммов по биогеографическим нишам и разделение вьетнамской популяции *B. pseudomallei* на отдельные субпопуляции, имеющие территориальную приуроченность.

Эпидемиологическую значимость имеют результаты обоснования принадлежности *B. thailandensis* к оппортунистическим патогенам, а также данные о толерантности *B. pseudomallei* к длительному воздействию низких температур, включая отрицательные. Это позволило предположить, что область экологической пригодности для сохранения возбудителя в природе гораздо шире, чем считалось ранее, и существует потенциальная возможность интродукции возбудителя на ряде территорий Российской Федерации.

Впервые на основании ретроспективного анализа нуклеотидных последовательностей семи консервативных генов, входящих в схему MLST, показано различное происхождение штаммов *B. pseudomallei*, выделенных во Франции от животных и из внешней среды в период активной эпизоотии мелиоидоза (1976-1978 гг.), а проведённый 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 лиц, пребывавших на эндемичных территориях в отличие от влияния этих факторов на развитие мелиоидоза у коренного населения.

С целью совершенствования подходов к лабораторной диагностике мелиоидоза автором 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*; теоретически обоснованы технологические решения, позволяющие существенно повысить эффективность средств идентификации видов комплекса «*B. pseudomallei*» и их дифференциации с филогенетически близкими бактериями рода *Burkholderia*; на основании определённых

биохимических профилей атипичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, определяющих их некорректную идентификацию автоматическими анализаторами, проведён сравнительный анализ характеристик коммерческих биохимических анализаторов в аспекте их пригодности для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа; для идентификации буркхольдерий II группы патогенности осуществлена оптимизация протокола времяпролетной масс-спектрометрии, что обеспечивает эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности. Теоретически обоснована степень информативности каждого из методов лабораторной диагностики мелиоидоза и их вклад в установление диагноза.

Сконструированы и запатентованы четыре диагностических набора для лабораторной диагностики мелиоидоза: набор праймеров, детектирующих β -лактамазы буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» молекулярных классов А, В и D; два набора праймеров для амплификации высокоиммуногенных мембранных протеинов *B. pseudomallei* для 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.

Полученные при выполнении диссертационной работы аналитические и экспериментальные данные использованы при подготовке документов:

– международного уровня – депонированы в GenBank NCBI нуклеотидные последовательности генов В-лактамаз молекулярных классов В и D: суперсемейства «металло-гидролазы / оксидоредуктазы» семейств P-CASP РНК-метаболизирующие гидролазы (KU053951, KU053952, KU053953, KU053954, KU053955) и глиоксалазы II (KU165828, KU165829, KU165830, KU165831, KU165832, KU165833), суперсемейства В-лактамазы/транспептидазы, семейства В-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 (QLUY00000000.1, QLVB00000000.1, QLUX00000000.1, QLVA00000000.1), а также штаммов дикого типа *B. pseudomallei* (QLVC00000000.1, PHRB00000000.1, PHRC00000000.1, WTLF00000000.1, WSRT00000000.1, WSRV00000000.1, WSRU00000000.1, WSPI00000000.1,

WUMQ00000000.1, WTLF00000000.1, WOWY00000000.1), *B. ceracia* (QLUZ00000000.1), *B. thailandensis* (PHRD00000000.1, WOXA00000000.1, WOWZ00000000.1); разработанные методические приёмы, алгоритмы анализа и генодиагностический набор реагентов используются 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 отражены в практическом руководстве «Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*», изданном на русском и вьетнамском языках (Волгоград, 2018);

– федерального уровня – практическое руководство «Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*» (Волгоград, 2018); методические рекомендации «Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неустановленного систематического положения» МР 3.1.0129-18; Методические указания «Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа. Организация и проведение в лабораториях различного уровня» МУ 4.2.3744-22; раздел референтных MALDI TOF спектров типичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* электронной базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM, размещённый 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), а также проект методических указаний «Порядок молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе референс-центров и национальных центров верификации диагностической деятельности»; депонированы в Государственной Коллекции Патогенных Бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ «М») полирезистентные варианты и инсерционные мутанты со сниженным уровнем устойчивости к β-лактамам штаммов *Burkholderia* spp. под номерами КМ 195, КМ 196, КМ 197, КМ 30 и КМ 32 и в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» – охарактеризованные типичные штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* дикого типа (справки о депонировании №№ 360-363 от 23.03.2012); сконструирован «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» PL B/D–EPh» по

ТУ 21.20.23-014-01898084-2016» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7785 от 07.11.2018.);

– учрежденческого уровня – паспорта штаммов коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора пополнены сведениями о биохимическом профиле штаммов *Burkholderia* spp. и профиле генов β -лактамаз молекулярных классов А, В и D; материалы анализа мирового опыта лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа, а также практические рекомендации, сделанные на основании проведённых исследований используются в лекционных курсах дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Оценка достоверности, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Представленная работа логически завершена, так как поставленные в ней автором задачи решены, сделаны научно-обоснованные выводы и получены практические решения. Достоверность результатов, полученных Захаровой И.Б., обусловлена продуманным дизайном исследования, достаточным объёмом и высоким методическим уровнем экспериментальных работ с применением современных и адекватных методов эпидемиологии и лабораторной диагностики мелиоидоза, а также корректных способов статистической обработки полученных автором оригинальных научных данных.

В исследовании использованы системный подход и специальные методы, включающие ретроспективный анализ, эпидемиологические, микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы, проведён анализ филогенетических связей внутри рода *Burkholderia* и аспектов структурной, сравнительной и функциональной геномики видов комплекса «*Burkholderia pseudomallei*», оценка эффективности методов лабораторной диагностики инфекции и разработка способов её повышения.

Полученные автором результаты, выводы и практические рекомендации статистически достоверны, аргументированы, отражают суть исследования, соответствуют названию работы, цели и поставленным задачам.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы диссертации могут быть использованы в лабораторной диагностике мелиоидоза, в дальнейшей разработке

диагностических препаратов, в научных исследованиях, посвящённых изучению буркхольдерий.

Общая оценка структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа изложена в форме монографии на 310 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 5 глав, содержащих анализ мирового опыта по проблеме исследования и экспериментальные данные, заключения, выводов и списка литературы, включающего 563 источника. Работа иллюстрирована 35 таблицами и 42 рисунками.

Во Введении автором обоснована актуальность проблемы и проанализирована степень её разработанности, сформулированы цель и задачи диссертационного исследования, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, методология исследования и положения, выносимые на защиту.

В главах диссертации представлены анализ имеющихся данных литературы по эпидемиологии, генетике и лабораторной диагностике мелиоидоза в соответствии с поставленной целью работы и результаты собственных исследований.

В главе 1 рассмотрены вопросы таксономии буркхольдерий, филогении и геномике видов комплекса *Burkholderia pseudomallei*, в том числе даны анализ аллельного полиморфизма и структуры вьетнамской популяции *B. pseudomallei* и территориального распределения сиквенс-типов *B. pseudomallei* по регионам Вьетнама, анализ дивергенции между видами *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* по признаку основных факторов вирулентности, рассмотрена функциональная геномика адаптации *B. pseudomallei* к стрессовым факторам внешней среды. Показано, что в процессе адаптации к различным нишам обитания представители комплекса *B. pseudomallei* сохранили высокую консервативность генов, ответственных за коровые функции клеток, гены, обеспечивающие выживание *in vivo*, достаточно консервативные между возбудителями сапа и мелиоидоза и более дивергентны у *B. thailandensis*. Результаты сравнительной геномики видов рода *Burkholderia* имеют важное значение как для фундаментальных исследований, связанных с изучением эволюционных связей, так и в прикладном направлении, являясь основой для поиска новых диагностических мишеней, целей терапевтического воздействия, а также вакцинопрофилактики.

В главе 2 представлены актуальные аспекты эпидемиологии мелиоидоза на современном этапе – дана оценка реализации путей передачи возбудителя и

факторов предрасположенности к мелиоидозу, дифференцированному его распространению в мире, выживаемости *B. pseudomallei* за пределами традиционных эндемичных регионов; изучена устойчивость *B. pseudomallei* к воздействию низких температур и при замораживании, дана характеристика морфологических изменений возбудителя в условиях холодового стресса; рассмотрена проблема мелиоидоза в неэндемичных регионах, проанализированы связи между трендом развития международного туризма и динамикой случаев заноса этой инфекции. Показана достаточно высокая вероятность завоза мелиоидоза в Россию, что наряду с отсутствием у клиницистов настороженности в отношении этой инфекции может иметь фатальные последствия для больного и сотрудников клинических лабораторий, поскольку регламентированный для таких лабораторий уровень биологической безопасности не предусматривает работу с возбудителями II группы патогенности.

Глава 3 посвящена проблемам идентификации буркхольдерий. Рассмотрены достоинства и недостатки существующих фенотипических методов и предложены пути их совершенствования.

В главе 4 рассмотрены особенности иммунодиагностики мелиоидоза. Показано, что хотя их использование может обеспечить быстрый презумптивный диагноз, необходимо учитывать неоднозначность отрицательных результатов и верифицировать данные серологических реакций с применением других методов, включая молекулярно-генетические.

Методы и технологии, основанные на анализе структуры генома, проанализированы в главе 5, предложены новые подходы к идентификации и дифференциации *B. pseudomallei*. На основании полученных данных разработан, зарегистрирован в установленном порядке и апробирован в Республике Вьетнам «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*».

Выводы обоснованы, корректны, логически вытекают из полученных автором результатов и полностью соответствуют целям, задачам и основным положениям, выносимым на защиту.

Материалы диссертации иллюстрированы достаточным для наглядного представления и доказательства количеством таблиц и рисунков.

Решение поставленных задач исследования, аргументированность выводов, вытекающих из представленных положений, позволяют считать диссертацию завершённой.

Достоинства, замечания и предложения к содержанию и оформлению диссертации

1. В соответствии с выполнением задачи № 2 «...определить закономерности территориальной приуроченности штаммов возбудителя с различными сиквенс-типами» в результатах желательно бы с эпидемиологической точки зрения уточнить неслучайное распределение штаммов различных сиквенс-типов по биогеографическим нишам, чем это обусловлено и с чем связано.

2. По тексту диссертации представлены предложения по новой классификации с номенклатурой, отражающей морфологические особенности колоний, дающая представление о морфотипе колонии по его названию. Несомненно, это важный результат исследования, однако, автор не включила его в новизну и теоретическую значимость исследований, что ещё бы усилило результативность и значимость диссертационной работы.

3. Рекомендация для дальнейших исследований диссертанта – показать диагностическую ценность MALDI-TOF с использованием созданных наборов референтных масс-спектров штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, что ещё более расширит диагностические возможности мелиоидоза с целью своевременности постановки диагноза больным.

Следует отметить, что в целом диссертация производит очень хорошее впечатление.

Материалы диссертации представлены 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. Результаты исследований были представлены на 26 Всероссийских и международных научных и научно-практических форумах.

Автореферат правильно и полно отражает содержание диссертационной работы, основные положения и выводы проведенного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Захаровой Ирины Борисовны «Мелиоидоз – актуальные вопросы современной эволюции и разнообразия *Burkholderia pseudomallei* в аспектах совершенствования лабораторной диагностики» на соискание учёной степени доктора биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной

научной задачи – новые данные в отношении экологии и эпидемиологии мелиоидоза, и совершенствование лабораторной диагностики данной инфекции.

Работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 № 335, от 02.06.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к докторским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», паспорту специальности 1.5.11. микробиология, а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент

Заместитель директора по научной и противоэпидемической работе
Федерального казенного учреждения
здравоохранения «Ставропольский
научно-исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека Российской
Федерации, д.м.н., профессор

Малецкая Ольга Викторовна
08.08.2022

Подпись Малецкой О.В. удостоверяю:
Начальник отдела кадров ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора

С.М. Исмаилова

Адрес: 355035, Ставропольский край, г. Ставрополь,
ул. Советская, тел. +7 (865-2) 26-03-12
Эл. почта: stavnipchi@mail.ru