

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Павлович Натальи Владимировны на диссертационную работу Захаровой Ирины Борисовны на тему: «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 диссертационного исследования

Диссертационная работа И.Б. Захаровой посвящена решению актуальной проблемы, а именно, поиску новых наиболее рациональных подходов и алгоритмов с целью совершенствования диагностики мелиоидоза, а также исследованию эволюции и генетического разнообразия штаммов *Burkholderia pseudomallei* различного происхождения.

В настоящее время мелиоидоз - тяжелое инфекционное заболевание человека и животных с высоким процентом летальности, эндемичные очаги которого зарегистрированы, преимущественно, в странах Юго-Восточной Азии и Австралии. Тем не менее, интенсификация туристического потока с посещением эндемичных стран, а также увеличение объема экспорта животных создает реальную угрозу завоза возбудителя в благополучные по мелиоидозу государства. Иллюстрацией этому может служить тот факт, что в последние годы количество случаев выявления заболевания в странах Европы и Америки увеличивается. В данной связи Россия с ее тесными экономическими, культурными и туристическими контактами со странами азиатского региона может входить в зону риска завоза инфекции на свою территорию. Однако полиморфизм клинических проявлений болезни и трудности в ее диагностике, отсутствие у клиницистов настороженности и достаточного опыта обосновывают необходимость подготовки специалистов разного профиля к возможному появлению мелиоидоза на территории РФ. Поэтому актуальность углубления наших знаний о механизмах эволюции буркхольдерий, расширении ареала их циркуляции, совершенствовании арсенала диагностических приемов с использованием современных молекулярно-биологических методов не вызывает сомнения. Именно этим проблемам посвящена диссертационная работа И.Б. Захаровой «Мелиоидоз - актуальные вопросы современной эволюции и разнообразия *Burkholderia pseudomallei* в аспектах совершенствования лабораторной диагностики».

Структура и объем диссертации

Диссертация выполнена в рамках 12 государственных тем, в трех из которых автор был ответственным исполнителем, в трех – руководителем. В

рамках выполнения совместной российско-вьетнамской НИР (№ государственной регистрации АААА-А18-118032790070-8) под руководством соискателя защищена кандидатская диссертация Буй Тхи Лан Ань на тему: «Характеристика штаммов *B. pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных на территории Социалистической Республики Вьетнам, и совершенствование алгоритмов их идентификации».

Работа изложена на 310 стр. компьютерного текста, содержит введение, 5 глав результатов, включая анализ современного состояния проблемы и результатов собственного исследования с их обсуждением, заключение и выводы. Список литературы включает 563 источника. Диссертация содержит обширный фактический материал, представленный высококачественно оформленным иллюстративным материалом в виде 35 таблиц и 42 рисунков.

Материал диссертации представлен в 121 опубликованной работе, из которых 4 – в зарубежных изданиях, 4 – вошли в учебно-методические издания, 1 – в коллективной монографии. Приоритет полученных результатов подтвержден 10 патентами на изобретение.

Цель исследования четко сформулирована, а 8 задач направлены на реализацию поставленной цели.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна, теоретическая и практическая значимость

Работа оформлена по монографическому типу, когда перед изложением экспериментальных данных приводится аналитический обзор современного состояния проблемы по конкретному направлению. Следует особо подчеркнуть, как одно из несомненных достоинств диссертации, что работа включает не только обширные экспериментальные данные, но и глубокий всесторонний теоретический анализ существующих на сегодняшний день фундаментальных проблем. Широкая научная эрудиция И.Б. Захаровой позволяет автору анализировать вопросы не только микробиологии и лабораторной диагностики мелиоидоза, но и затрагивать в работе сложные аспекты эпидемиологии, экологии, инфекционной патологии. Безусловной заслугой диссертанта является свободное изложение материала богатым грамотным русским языком при минимальном употреблении научных клише. **Положения, выносимые на защиту**, достаточно четко сформулированы и доказаны полученными автором доказательными результатами исследования.

Достоверность полученных результатов основана на анализе значительного объема литературных данных и статистической обработке собственных результатов.

Научная новизна работы заключается в том, что автору на примере вьетнамских штаммов удалось доказать, что определенные генотипы возбудителя мелиоидоза строго приурочены к территории циркуляции. Весьма убедительным является пример эпидемиологического и генетического расследования гибели медведей, когда было доказано, что один из 4-х умер от мелиоидоза, завезенного из Камбоджи, тогда как 3 других - от местных Вьетнамских штаммов.

Впервые показано, что возбудитель мелиоидоза обладает широкими (если не уникальными) адаптационными способностями, в частности, при постепенной адаптации к низким температурам (не характерным для оптимальных условий *B. pseudomallei*) бактерии сохраняют жизнеспособность при минус 18 в течение 25 суток. Автор делает при этом закономерный вывод, что ареал циркуляции возбудителя может быть значительно шире, чем считалось ранее, и не ограничиваться субтропическим и тропическим климатом. Следовательно, нельзя исключить вероятность расширения зоны циркуляции бактерий в ранее благополучные регионы. Учитывая глобальное потепление климата, диссертант четко обосновывает опасность возникновения инфекции на территориях, ранее благополучных по мелиоидозу. Подтверждением этому могут служить оригинальные находки, обнаруженные при молекулярно-генетическом исследовании штаммов из Ботанического сада Франции, когда было показано, что выделенные от погибших животных культуры отличались от буркхальдерий из внешней среды.

Мировой приоритет имеют полученные соискателем данные о ключевых признаках, определяющих корректность идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с атипичными биохимическими признаками.

Получены белковые профили штаммов *B. pseudomallei* различного происхождения, которые дополнили базу данных MALDI-TOF- Biotyper.

В результате поиска мишеней для проведения генотипирования и дифференциации буркхальдерий обнаружены специфические локусы (β -лактамазы классов В и D), сконструированные праймеры к которым позволяют проводить идентификацию и дифференциацию *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*.

Теоретическая значимость представленной работы включает выдвинутую автором гипотезу, которую подтверждают полученные экспериментальные данные, о постепенной адаптивной эволюции

возбудителя с формированием новых сиквенс-типов в зависимости от конкретного экологического окружения.

На основании проведенного сравнительного исследования генов вирулентности *B. thailandensis* и других буркхольдерий соискателем выдвинута гипотеза о том, что эти бактерии нужно рассматривать как возбудителей оппортунистических инфекций, а не в качестве авирулентного вида, как считалось ранее.

Для обеспечения эффективной белковой экстракции для масс-спектрометрии при необходимом уровне биологической безопасности соискателем проведена оптимизация протокола пробоподготовки образцов, содержащих микроорганизмы II группы патогенности.

Автором предложена новая классификация возбудителя мелиоидоза по морфологическим особенностям колоний с включением новых морфовариантов.

Материалы диссертации вошли в проект Методических Указаний «Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа, организация и проведение в лабораториях различного уровня». Запатентованы и депонированы полиантибиотикорезистентные штаммы возбудителя мелиоидоза в РосНИПЧИ «Микроб» и типичные штаммы *B. pseudomallei* - в ФБУН ГНЦ ПМБ (г. Оболенск) (Федеральный уровень внедрения). Сконструированы рекомбинантные штаммы *E. coli* с антигенами возбудителя мелиоидоза. В GenBank зарегистрированы нуклеотидные последовательности возбудителя мелиоидоза. Все вышеперечисленное определяет несомненную **практическую значимость** диссертации.

Основные положения, выдвинутые автором для публичной защиты, и выводы достаточно аргументированы и подтверждены обширным фактическим материалом.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе в целом

Диссертация И.Б. Захаровой заслуживает несомненной положительной оценки, так как содержит богатый аналитический и экспериментальный материал, характеризующийся актуальностью, научной новизной, теоретической и практической значимостью. В связи широким представлением в работе различных аспектов проблемы «Мелиоидоз» целесообразно, на мой взгляд, при минимальной корректировке формы оформление диссертации в виде монографии. Безусловным достоинством работы является не только теоретическая разработка специфических праймеров, позволяющих дифференцировать бактерии комплекса *B.*

pseudomallei и *B. cepacia in silico*, но и их апробация при исследовании клинического материала от больных мелиоидозом (на базе Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра, г. Ханой) и образцов из окружающей среды.

Важным разделом работы является сравнительное изучение информативности и достоверности методов микробиологической и иммунологической диагностики мелиоидоза. Достаточно убедительно на основании анализа данных литературы и результатов собственного исследования автор доказывает, что эти методы могут быть использованы, однако требуют дополнительного подтверждения с применением других (предпочтительно молекулярно-генетических) методов.

В автореферате достаточно полно представлен материал диссертации с отражением всех аспектов проведенного исследования.

Из замечаний рекомендательного характера хотелось бы отметить следующее:

1. Некоторые таблицы (№ 34, 35), по моему мнению, очень перегружены. Возможна группировка по количеству штаммов с идентичными признаками с выделением штаммов только с атипичными свойствами. Это облегчит восприятие и информативность материала.

2. Различная морфология бактерий из одной колонии при электронной микроскопии может быть объяснена не только изменчивостью возбудителя, но и вероятностью роста исследуемой колонии не только как потомство единственной клетки, но и возможностью формирования колонии из нескольких клеток.

3. При всей многоплановости представленной работы, весьма желательным, на мой взгляд, в заключении представить мнение специалиста по редкой для России инфекции по дальнейшим перспективам исследования различных аспектов проблемы «Мелиоидоз».

Считаю, что по актуальности темы, методическому уровню, объему и достоверности полученного фактического материала, его научной новизне, теоретической и практической значимости, 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 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 11.09.2021 г. № 1539) предъявляемым ВАК РФ к докторским диссертациям, а ее автор достоин присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент

Главный научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора),
доктор медицинских наук  Наталья Владимировна Павлович

Адрес: 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40

Телефон: 8 (863) 240-27-03

E-mail: plague@aaanet.ru

Подпись Н.В. Павлович заверяю

Начальник отдела кадров
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора



Е.Е. Стоян