

## Отзыв официального оппонента

на диссертацию **Лопастейской Яны Анатольевны** «Системы автоматизированного микробиологического анализа в лабораторной диагностике патогенных буркхольдерий», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

**Актуальность темы диссертации.** Возбудители сапа и мелиоидоза (*Burkholderia mallei* и *B. pseudomallei*) относятся к микроорганизмам II группы патогенности (опасности), вызывают тяжелые инфекционные заболевания с аспирационным, алиментарным и контактным механизмом заражения. Существует реальная угроза заноса возбудителей на территорию России из эндемичных стран вследствие возможного возникновения чрезвычайных биологических ситуаций в результате техногенных и природных катастроф. Учитывая высокую инфекциозность возбудителей мелиоидоза и сапа при аэрогенном заражении, формирование тяжелых форм инфекций, трудности их диагностики и высокую летальность, следует считаться с мнением отечественных и зарубежных специалистов, рассматривающих возможность применения *B. pseudomallei* и *B. mallei* в качестве биологического оружия. Особую проблему представляют клинические формы инфекции с длительным течением, при которых даже с использованием бактериологического метода, как «золотого стандарта» идентификации, возможна регистрация отрицательных результатов. Многообразие клинических форм и отсутствие патогномичных симптомов сапа и мелиоидоза практически исключают возможность постановки диагноза только на основании клинической картины, в связи с этим возрастает роль лабораторных методов в верификации диагноза. На сегодняшний день можно констатировать, что существующие методы обнаружения патогенных буркхольдерий оказываются недостаточно эффективными для экспресс-диагностики, а идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза по-прежнему является трудоемкой задачей. Традиционная лабораторная диагностика, направленная на выделение чистой культуры возбудителей с последующей ее идентификацией, позволяет дать положительный ответ лишь через 36-48 ч. Серологические методы дают более быстрые результаты, но обладают относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью из-за возможных перекрестных реакций с гетерологичными видами микроорганизмов и антигенной вариабельности штаммов. При диагностике сапа и мелиоидоза отмечен достаточно высокий процент лабораторных ошибок идентификации возбудителей. Измененные биохимические свойства *B. pseudomallei* и *B. mallei* в автоматических

системах идентификации зачастую приводят к регистрации ложноотрицательных или ложноположительных результатов.

В свете вышеизложенного заявленная цель рецензируемой работы - совершенствование алгоритмов идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа - является, безусловно, актуальной.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации,** основывается на использовании большого фактического материала, полученного в повторяющихся экспериментах и подвергнутого статистической обработке. Достоверность полученных результатов подтверждается табличными и графическими данными, грамотной интерпретацией и, поэтому, не вызывает сомнений. Значительный объем исследований, проведенных с использованием современных методов, позволили последовательно решить стоявшие перед автором задачи, а также обосновать все выдвинутые на защиту положения и выводы.

**Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.**

Автор, используя различные биохимические идентификационные тесты, исследовала и охарактеризовала фенотипические признаки, имеющие принципиальное значение для корректного установления видовой принадлежности культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* и проведения внутривидовой дифференциации возбудителей. Заслуживает внимания установленный факт, что при проведении биохимической идентификации исследуемых культур возбудителя мелиоидоза совокупность отрицательных результатов пяти тестов  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы,  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазы, фосфатазы и наличия активности D-целлобиазы, L-пролинариламидазы и тирозинариламидазы приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TugA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. serasia*.

Разработанный диссертантом комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивает эффективную белковую экстракцию, высокую воспроизводимость масс-спектрометрического анализа и необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии клеток *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Сформированные идентификационные масс-спектры патогенных видов *Burkholderia* spp. и разработанный оригинальный раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.<sup>TM</sup> для идентификации и типирования изолятов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, позволяют

осуществлять видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с приемлемой достоверностью.

**Практическая и теоретическая значимость** полученных результатов заключается в том, что при участии соискателя разработаны разделы проектов методических рекомендаций «Создание баз данных референсных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности для проведения автоматической идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии» и «Лабораторная диагностика возбудителей мелиоидоза и сапа». Полученные автором результаты исследований использованы при формировании единой базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper», зарегистрированной Федеральной службой по интеллектуальной собственности (№ регистрации в Реестре баз данных 2016620345 от 15.03.2016), а также при составлении ряда нормативно-методических документов учрежденческого уровня внедрения. Комплекс технологических приемов использования автоматизированных систем микробиологического анализа, предложенный диссертантом, применяется для идентификации, типирования, сравнительного анализа штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*, паспортизации и углубленного изучения коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии в определении цели и задач исследования, проведении анализа литературных данных, большого количества исследований с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа, статистической обработке и интерпретации полученных данных.

**Общая характеристика содержания диссертации.** Работа оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к рукописям диссертаций, изложена на 123 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, 2 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 214 источников, в том числе 30 отечественных и 184 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям текста диссертации.

Во введении автором обоснованы актуальность исследования, степень научной разработанности темы, сформулированы цель и пять задач исследования. Приведена основная информация по результатам работы, новизне, практической значимости, методологии и методам исследования и апробации. Пять положений, выносимых на

защиту, отражают основные итоги работы. Описана структура диссертации, дана информация о публикациях.

В первой главе диссертационной работы (обзор литературы) рассмотрены данные научных публикаций, касающиеся разных аспектов исследуемой проблемы. Изложены сведения по современной распространенности и эпидемиологических особенностях мелиоидоза и сапа, микробиологической характеристике возбудителей, актуальных проблемах бактериологической диагностики указанных инфекций. Материал изложен кратко, но достаточно информативно, с необходимыми элементами анализа.

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление об объеме выполненных исследований, используемых питательных средах, условий культивирования микроорганизмов, пробоподготовке, обеспечивающей как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов клеток патогенных буркхольдерий. Работа проведена с использованием 53 штаммов *B. pseudomallei*, 14 штаммов *B. mallei*, 5 штаммов *B. thailandensis*, а также 9 штаммов микроорганизмов комплекса *Burkholderia cepacia* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Идентификацию микроорганизмов в системах бактериологического анализа проводили с использованием планшетов IDS на платформе MICROTAX (биохимические наборы Micronault IDS (SY-Lab) с применением для регистрации результатов микропланшетного ридера MT-1 (SyLAB, Австрия), либо оценочных таблиц SY-Lab Microtax; микробиологического анализатора Vitek 2 (Biomereux) с оценкой биохимического профиля штаммов на идентификационных картах Vitek GN (Biomereux); масс-спектрометрическое профилирование штаммов буркхольдерий осуществляли на масс-спектрометре Axima Confidence™ (Shimadzu). Полученные результаты статистически обработаны.

В главе 3 «Идентификация буркхольдерий группы «*pseudomallei*» по признакам биохимической активности» представлены результаты идентификации патогенных буркхольдерий с использованием наборов Micronault IDS. Учитывая то обстоятельство, что с использованием полуавтоматических тестов типа Micronault IDS могут быть получены нестабильные результаты, в том числе и в отношении родоспецифических и фенотипических признаков буркхольдерий, автором указывается на неприменимость данных идентификационных наборов широкого спектра и их аналогов для определения видовой принадлежности глюкозо-неферментирующих грамотрицательных оксидазоположительных подвижных аэробных микроорганизмов, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholderia*.

Для идентификации патогенных буркхольдерий на микробиологическом анализаторе Vitek 2 использовали 40 коллекционных штаммов *B. pseudomallei* и 12 штаммов *B. mallei*. На исследованной выборке с высокой статистической достоверностью автором показано, что совокупность ряда отрицательных и положительных результатов биохимических тестов приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, либо к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*, в связи с чем диссертант делает вывод о необходимости дальнейшего расширения базы идентификационных ключей платформы VITEK 2 в отношении штаммов *B. pseudomallei* с атипичными профилями биохимической активности. Вместе с тем, акцентирует внимание на том, что, учитывая реальную возможность завоза в нашу страну данного опасного заболевания, инфекционисты и специалисты клинических диагностических лабораторий, использующих в работе микробиологические анализаторы, должны быть осведомлены о возможности ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*, а также о необходимости направления клинических образцов от пациентов с неясным диагнозом, побывавших в эндемичных по мелиоидозу регионах, на исследование непосредственно в специализированные лаборатории.

Результатом исследований, выполненных в главе 4 «Идентификация буркхольдерий группы «*pseudomallei*» с использованием сравнительного анализа масс-спектров консервативных клеточных белков», стала разработка методологического подхода к идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных белков. В ходе работы был оптимизирован протокол пробоподготовки культур возбудителей в соответствии с требованиями биологической безопасности при манипуляциях с ПБА II группы патогенности, подобраны условия культивирования штаммов и сформирован набор референсных масс-спектров для идентификационной базы данных S.A.R.A.M.I.S.<sup>TM</sup> (Anagnostec GmbH). Анализ коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий продемонстрировал возможность достоверного определения таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов до видового уровня. Пополненная база масс-спектральных характеристик в дальнейшем позволит, по мнению автора, проводить экспресс-идентификацию изолятов, подозрительных на принадлежность к возбудителям мелиоидоза и сапа, а также будет являться основой для разработки схем хемотипирования штаммов буркхольдерий методом масс-спектрометрии.

В «Заключении» кратко подведены итоги работы, приведены обобщающие материалы по двум главам собственных исследований, изложены рекомендации. Шесть

выводов диссертации основываются на представленном экспериментальном материале и логически завершают проделанную работу.

**Завершенность и качество оформления диссертационной работы.** Оценивая диссертацию в целом, можно заключить, что она представляет законченное самостоятельное исследование и вносит значительный вклад в совершенствование алгоритмов идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа. Научная новизна, положения, выносимые на защиту, практические рекомендации обоснованы и соответствуют цели и решению поставленных задач. Работа основана на значительном фактическом материале, собранном, обобщенном и проанализированном лично автором или при его участии. Основные результаты диссертации отражены в девяти опубликованных работах, четыре из которых – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации. Опубликованные работы и автореферат отражают содержание диссертации.

Положительно оценивая работу в целом и подчёркивая её актуальность, новизну и значимость для практики, следует обратить внимание автора на некоторые недостатки, связанные, в основном, с небрежным оформлением текста (пунктуационные ошибки, опечатки, отсутствие пробелов между цифровыми показателями и используемыми символами, нет унифицированности в сокращениях и т.п.), а также редакционно-стилистического плана, в частности, - действительно ли использовались именно клетки штамма *E. coli* CCUG 10797 для калибровки (стр. 43)? Согласно руководству к масс-анализатору MicroFLEX (Bruker Daltonisc), в качестве стандарта используют экстракт клеточных белков штамма *E. coli* DH5a с двумя дополнительными белками. Не совсем корректно использовать термин «препараты клеток». О каких клеточных суспензиях идет речь (стр. 63, абзац 3)? На страницах 43, 66 говорится об использовании абсолютного спирта, при этом на стр. 64 автор рекомендует применять 96 % этанол.

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не снижают теоретической и практической ценности диссертации.

### **Заключение**

Диссертация Я.А. Лопастейской «Системы автоматизированного микробиологического анализа в лабораторной диагностике патогенных буркхольдерий» является завершенной научно-квалификационной работой, в основу которой положен фактический материал по совершенствованию алгоритмов идентификации *Burkholderia*

*pseudomallei* и *B. mallei* с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа.

Соответствие рецензируемого исследования специальности 03.02.03 «микробиология» убедительно обосновано целью, задачами, методическими подходами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами.

По значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её разрешению, научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Яна Антоновна Лопастейская заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Официальный оппонент:

Загоскина Татьяна Юрьевна,  
заведующая отделом подготовки и  
усовершенствования специалистов  
Федерального казенного учреждения здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного  
Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»  
Федеральной службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и благополучия  
человека  
доктор медицинских наук

*Загоскина*

664047 г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78.

Тел. 8(3952)22-01-39; E-mail - [www.irkutsk.ru/chumin.ru](http://www.irkutsk.ru/chumin.ru)

Подпись Т.Ю. Загоскиной заверяю:

Начальник отдела кадров

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора



*Шангареева*

Н.И. Шангареева