

## ОТЗЫВ

### официального оппонента на диссертационную работу

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

Актуальность работы. Патогенные буркхольдерии *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* являются возбудителями таких тяжелых, часто смертельных заболеваний человека и животных как мелиоидоз и сап. Ежегодно в мире регистрируется в среднем около 165 000 случаев мелиоидоза, из которых 89 000 заканчиваются летально (Limmathutsakul et al., 2016; Suttisunhakul et al., 2017). На территории Российской Федерации в настоящее время данные возбудители не выявляются. Однако сап среди животных отмечается в ряде сопредельных с Россией стран (Турция, Иран, Афганистан, Китай, Монголия), а природные эндемичные очаги мелиоидоза присутствуют на территории Южной и Юго-Восточной Азии, Индонезии, Западной и Восточной Африке, Австралии, Центральной и Южной Америке. Постоянно расширяющиеся торгово-экономические связи создают реальные предпосылки завоза данных инфекций в нашу страну. При этом необходимо отметить, что разнообразие клинических форм мелиоидоза (от септицемии с множественными некротическими поражениями внутренних органов до хронической очаговой инфекции), быстрое течение болезни, способность сохраняться в организме в латентной форме в течение многих лет приводят к тому, что в неэндемичных регионах *B. pseudomallei* является трудно диагностируемым заболеванием. Кроме того, значительное сходство фенотипических признаков *B. pseudomallei* и *B. mallei* затрудняет их дифференциацию методами микробиологического анализа, а идентификация с использованием микробиологических биохимических анализаторов часто приводит к ошибкам. Все вышесказанное определяет актуальность диссертационного исследования Я.А. Лопастейской, посвященной совершенствованию алгоритмов идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа.

В задачи исследования входило проведение сравнительного анализа эффективности применения коммерческих полуавтоматических и автоматических биохимических идентификационных тестов для подтверждения видовой принадлежности и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа; выявление набора биохимических тестов, имеющих ключевое значение для точной идентификации видов патогенных буркхольдерий и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов; разработка комплекса методиче-

ских приемов пробоподготовки, обеспечивающих необходимый уровень биологической безопасности при масс-спектрометрическом профилировании культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* методом MALDI-TOF MS; получение набора характеристических масс-спектров возбудителей мелиоидоза и сапа и создание раздела электронной базы S.A.R.A.M.I.S.<sup>TM</sup>, включающей MALDI-TOF спектры для идентификации штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а также разработка дополнений к регламентированным схемам лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа при использовании современных систем микробиологического анализа.

Для решения поставленных задач использовались как традиционные (бактериологическое исследование, биохимические тесты), так и современные методы микробиологической диагностики (масс-спектрометрический анализ). Все примененные методики адекватны поставленным задачам и высокоинформативны. Их использование свидетельствует о высокой профессиональной подготовке диссертанта. Работа проведена на 81 штамме буркхолдерий, хранящихся в коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, среди которых 53 изолята относились к *B. pseudomallei*, а 14 – к *B. mallei*. Используемые в работе штаммы по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам были типичными представителями рода *Burkholderia*. Полученные экспериментальные данные статистически обработаны. Все вышеизложенное указывает, что научные положения и выводы, сформулированные в работе, достаточно обоснованы.

В результате проведения исследований диссертантом получен ряд приоритетных сведений, отраженных в разделе Научная новизна:

- с использованием различных биохимических идентификационных тестов исследованы и охарактеризованы фенотипические признаки, имеющие принципиальное значение для корректного установления видовой принадлежности культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* и проведения внутривидовой дифференциации возбудителей (Замечание – данный пункт научной новизны можно было бы конкретизировать);

- изучение биохимической активности коллекционных штаммов различных видов буркхолдерий позволило автору впервые установить, что совокупность положительных результатов при тестировании продукции D-целлобиазы, L-пролинариламидазы, тирозинариламидазы и отрицательных при определении  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы,  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазы, фосфатазы, является недостаточным для идентификации штаммов *B. pseudomallei*, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазы, тирозинариламидазы и L-пролинариламидазы ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*;

– учитывая, что *B. pseudomallei* и *B. mallei* относятся ко II группе патогенности, важным является разработка диссертантом комплекса методических приемов пробоподготовки, обеспечивающих эффективную белковую экстракцию, высокую воспроизводимость масс-спектрометрического анализа и необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии клеток *B. pseudomallei* и *B. mallei*;

– несомненным достоинством диссертации является получение идентификационных белковых масс-спектров патогенных видов *Burkholderia* spp., позволяющих осуществлять видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа. С использованием программного обеспечения S.A.R.A.M.I.S.<sup>TM</sup> сформирована электронная база данных установленных биомаркеров, предназначенная для идентификации и типирования изолятов *B. pseudomallei* и *B. mallei*. База данных зарегистрирована в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (№2016620345 от 15.03.2016 г.).

**Практическая ценность исследования.** Разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования методические приемы, аналитические алгоритмы используются для паспортизации коллекционных штаммов патогенных буркхолдерий и применяются в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза при Волгоградском НИПЧИ при идентификации и типирования штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Материалы исследования вошли в ряд нормативно-методических документов федерального и учрежденческого уровня внедрения (*Замечание* – не совсем понятно, какие из приведенных документов являются методическими рекомендациями федерального, а какие учрежденческого уровня).

Диссертация обладает внутренним единством и построена по традиционному плану, изложена на 123 страницах и включает все необходимые разделы – введение, обзор литературы, собственные исследования, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, содержащий 215 источников, из которых 30 отечественных. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками.

Во введении четко изложена актуальность, степень разработанности проблемы и приведена основная информация по результатам диссертационного исследования. В пяти положениях, выносимых на защиту, отражены основные результаты и достижения диссертационной работы.

Обзор литературы, занимающий 22 страницы, включает три раздела. В первом представлена информация о распространенности и эпидемиологических особенностях сапа и мелиоидоза в современный период. В следующих разделах дана микробиологическая характеристика возбудителей данных болезней и освещены актуальные проблемы их бактериологической диагностики. Литературный обзор написан хорошим литературным языком и дает

представление о современном состоянии исследований и проблемах, присутствующих в лабораторной диагностике *B. pseudomallei* и *B. mallei* (Замечание – хорошо понимая диссертанта о невозможности поместить в литобзор всю информацию о способах идентификации буркхолдерий, мне кажется, необходимо было более подробно остановиться на ПЦР анализе, учитывая положительный опыт отечественных исследователей (Лемасова с соавт., 2016) в данном направлении).

В первой главе собственных исследований достаточно подробно описаны использованные при проведении диссертационного исследования материалы и методы.

Следующая глава собственных исследований посвящена идентификации коллекционных штаммов *B. pseudomallei* с использованием биохимических наборов Micronault IDS, широко применяемых для быстрой идентификации различных клинических грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, а также на микробиологическом анализаторе Vitek 2. В результате диссертантом установлено, что значительная вариабельность таких признаков как активность фосфодиэстеразы, хитиназы, пролинамидазы, окисления мальтозы и ферментация глюкозы не позволяет идентифицировать большинство исследованных штаммов *B. pseudomallei* с использованием наборов Micronault IDS (а также их аналогов). Сходные результаты были получены и на автоматическом анализаторе Vitek 2 (из 52 корректно идентифицировано только 35 штаммов). Полученные результаты способствовали проведению дальнейшей работы по поиску более надежных методов идентификации и дифференциации штаммов патогенных буркхольдерий.

В результате автор остановил свой выбор на высокочувствительном методе анализа белковых компонентов клеток с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, использованию которого для идентификации буркхольдерий посвящена 4 глава собственных исследований. В итоге диссертантом отработан протокол пробоподготовки культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* в соответствии с требованиями биологической безопасности при работе с ПБА II группы патогенности, подобраны условия культивирования штаммов, получены качественные масс-спектры возбудителей сапа и мелиоидоза, сформирован набор референтных масс-спектров, которые помещены в базу данных SARAMIS. Использование предложенных СуперСпектров суммарных клеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei* обеспечивают 100 % идентификацию данных патогенных буркхольдерий (Вопрос – уточните, пожалуйста, какая минимальная концентрация бактерий необходима для проведения масс-спектрометрического анализа).

Научные положения работы достоверны, о чем указывает проведенный достаточно значительный объем экспериментальных исследований, а полученные данные статистически обработаны. Считаю необходимым отметить, что подобные исследования в настоящее время

активно проводятся зарубежными учеными (Niyompanich et al., 2015; Wang et al., 2016; Suttisunhakul et al., 2017), что с одной стороны, подтверждает актуальность работы, а с другой указывает на ее соответствие мировому уровню и вклад диссертанта в развитие отечественной науки.

Диссертационную работу завершает «*Заключение*», а также «*Выводы*», которые четко сформулированы, отражают основные результаты исследования и соответствуют поставленным целям и задачам. «*Заключение*» хочется отметить особо, так как в данном разделе не только приведена характеристика, распространение возбудителей сапа и мелиоидоза, основные этапы диссертационной работы и результаты, но и сопоставление полученных данных со сведениями других исследователей.

Экспериментальные материалы, полученные при выполнении диссертационной работы, обсуждены на научных конференциях разного уровня (международных, межгосударственных, всероссийских, институтских) и достаточно полно отражены в 9 опубликованных работах, из которых 4 статьи – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для опубликования основных результатов диссертации на соискание научной степени. Диссертация выполнена в рамках государственной темы № 081-3-13 (№ гос. регистрации 01201351985).

Имеющиеся редакционные опечатки (расхождение номеров страниц в оглавлении и тексте) и сделанные замечания по ходу анализа работы не снижают ее научной и практической значимости.

**Заключение.** Диссертационное исследование Я.А. Лопастейской является законченной научно-квалификационной работой, в которой предложены усовершенствованные алгоритмы идентификации и дифференциации штаммов патогенных буркхолдерий с применением современных систем автоматизированного микробиологического анализа, которые внедрены в практику работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями мелиоидоза и сапа на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Работа выполнена на высоком научном уровне и написана лично диссертантом. Полученные экспериментальные данные обладают новизной, выводы и рекомендации основаны на значительном и тщательно сделанном экспериментальном материале, который статистически обработан, что указывает на их достоверность и обоснованность. Автореферат включает основные положения диссертации. По области исследований, объекту, целям и задачам, используемым методам, полученным результатам данная диссертационная работа соответствует пунктам 2 и 3 специальности 03.02.03 – микробиология отрасли медицинские науки.

Таким образом, по своей новизне, методическому уровню и актуальности диссертационная работа Я.А. Лопастейской «Системы автоматизированного микробиологического анализа в лабораторной диагностике патогенных буркхольдерий» соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент  
Заднова Светлана Петровна  
доктор биологических наук, ведущий научный  
сотрудник лаборатории патогенных вибрионов  
ФКУЗ «Российский  
научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб» Федеральной Службы  
по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46  
тел. +7(8452) 26-47-23  
e-mail: rusrap1@microbe.ru

Подпись С.П. Задновой  
заверяю:  
и.о. начальника отдела кадров ФКУЗ «Российский  
научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб» Роспотребнадзора



Заднова С.П.

Шамшурина Е.Ф.