

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации 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

В связи с развитием транспортного сообщения между странами, расширением туристических направлений, значительными миграционными потоками сохраняется возможность завоза на территорию Российской Федерации возбудителей сапа и мелиоидоза. В этой связи важное значение имеет быстрое выявление патогенов и их идентификация. В последние годы в практику здравоохранения активно внедряются новые микробиологические полуавтоматические и автоматические идентификационные системы. Однако вопрос об эффективности данных подходов для определения видовой принадлежности *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* остается нерешенным. Не определен оптимальный набор дифференцирующих тестов для патогенных буркхольдерий, не рассмотрены возможности совершенствования схем лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза. В связи с этим, диссертационная работа Лопастейской Я.Н., направленная на совершенствование алгоритмов идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа, несомненно, актуальна.

Для достижения поставленной цели Яна Анатольевна решает задачи по следующим направлениям:

- провести сравнительный анализ эффективности применения полуавтоматических и автоматических биохимических идентификационных тестов для определения видовой принадлежности возбудителей сапа и мелиоидоза,
- выявить набор биохимических маркеров, имеющих ключевое значение при идентификации видов патогенных буркхольдерий,
- разработать методические приемы, обеспечивающие необходимый уровень биологической безопасности при подготовке штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* для исследования с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии,
- получить и охарактеризовать масс-спектры возбудителей мелиоидоза и сапа, разработать раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S для идентификации данных видов патогенов,
- предложить дополнения к регламентированным схемам лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа в части применения современных систем микробиологического анализа.

На первом этапе своей работы автором была определена эффективность идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью систем Micronault IDS (SY-Lab) и микробиологического анализатора VITEC 2 (Biomereux). Установлено, что использование наборов Micronault IDS не позволило корректно идентифицировать до вида большинство изученных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Ряд культур были определены как виды *Sphingomonas paucimobilis*, *Pantoea agglomerans*, *Ochrobactrum anthropic*. Видовая принадлежность была подтверждена только для 80 % изученных штаммов *B. ceracia*. Вариабельными оказались признаки активности фосфодиэстеразы, хитиназы, пролинамидазы, ассимиляции мальтозы и ферментации глюкозы. На основании

полученных результатов автором сделан вывод о неприменимости идентификационных наборов Microault IDS для определения видовой принадлежности микроорганизмов, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholderia*.

С применением анализатора Vitek 2 66,7 % штаммов возбудителя сапа идентифицированы как *B.mallei*, 77,5 % штаммов возбудителя мелиоидоза – как *B. pseudomallei*. Для ряда культур видовая принадлежность определена как *S. paucimobilis*, *B. cepacia* или как группа видов *S. paucimobilis/B. mallei*, *B. cepacia/B. pseudomallei*. На основании полученных данных автором были выбраны биохимические маркеры, которые определяют точность идентификации видов патогенных буркхольдерий. Показано, что при отрицательных результатах тестов на наличие β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA), β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG), фосфатазы (PHOS) и положительных на активность D-целлобиазы (dCEL), L-пролинариламидазы (ProA), тирозинариламидазы (TyrA) идентификация штаммов возбудителя мелиоидоза проходит с низкой дискриминацией. В то же время наличие у ряда штаммов *B. pseudomallei* активности D-целлобиазы и отрицательных результатов по тестам NAGA, TyrA, ProA приводит к ошибочному определению их принадлежности к *B. cepacia*. Для возбудителя сапа такими тестами являлись: активность L- пролинариламидазы, тирозинариламидазы и β -N-ацетилгалактозаминидазы. Результаты исследования указывают на необходимость дальнейшего расширения базы идентификационных ключей платформы VITEK 2 в отношении штаммов возбудителя мелиоидоза с атипичными профилями биохимической активности.

На следующем этапе исследований Яной Анатольевной были изучены масс-спектры клеточных белков патогенных буркхольдерий с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для проведения исследований автором были подобраны оптимальные условия культивирования патогенов перед проведением анализа: питательная среда – агар Luria, срок выращивания – не более 24 ч; определен эффективный способ подготовки проб: экстракция смесью муравьиной кислоты и ацетонитрила после обработки этанолом. Для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии подготовлен набор референсных для каждого вида масс-спектров, которые были импортированы в электронную базу данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.™. Продемонстрирована высокая достоверность (не ниже 75 %) определения таксономической принадлежности коллекционных штаммах патогенных буркхольдерий с использованием прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных белков патогенов, выполненного в соответствии с предложенными автором методическими подходами. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные позволили усовершенствовать алгоритмы идентификации и дифференциации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза с применением современных систем автоматизированного микробиологического анализа.

Выводы, сделанные автором обоснованы, не вызывают сомнения и соответствуют цели и поставленным задачам. Положения, выносимые на защиту, отражают результаты проведенных исследований. Основное содержание диссертации отражено в девяти опубликованных работах, четыре из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Материалы работы нашли применение при подготовке методических рекомендаций «Создание баз данных референсных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности для проведения автоматической идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии» (федеральный уровень) и формировании единой базы данных «Белковые

профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper», зарегистрированной Федеральной службой по интеллектуальной собственности (№ 2016620345 от 15.03.2016). Предложенные подходы нашли широкое применение для паспортизации и расширенной идентификации коллекционных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, активно используются в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

Таким образом, диссертационная работа Лопастейской Я.А. «Системы автоматизированного микробиологического анализа в лабораторной диагностике патогенных буркхольдерий» посвящена актуальной проблеме, выполнена на большом материале с использованием современных технологий, полученные результаты имеют новизну, теоретическую и практическую значимость, могут быть использованы для повышения эффективности лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза. Диссертационная работа соответствует критериям "Положения о порядке присуждения ученых степеней" пп. 9, 10, 11 и 13, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор Лопастейская Яна Анатольевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Заведующая лабораторией
молекулярной диагностики
Федерального казенного учреждения
здравоохранения Российский
научно-исследовательский
противочумный институт "Микроб"
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека
кандидат биологических наук

Н.А. Осина

410005, г. Саратов,
ул. Университетская, 46
Тел. 8(8452) 51-52-12, 89198278822
e-mail: rusrap1@microbe.ru

Подпись Н.А. Осинной ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров
ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб"
Роспотребнадзора



Е.Ф. Шамшурина