

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Бондаревой Ольги Сергеевны на тему:
«Типирование штаммов возбудителя сапа на основе анализа тандемных повторов и
дифференцирующих регионов генома», представляемую на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология**

Актуальность темы диссертационного исследования

За последние 20 лет отмечается тенденция к увеличению частоты возникновения вспышек сапа у лошадей и расширению его ареала. в связи с этим сап относят к «возвращающимся» инфекционным заболеваниям. По данным Всемирной организации по охране здоровья животных (OIE, World Organisation for Animal Health) и международного общества по проблемам инфекционных болезней, в настоящее время сап эндемичен для Ирана, Бразилии, Индии, Монголии. Единичные случаи сапа зарегистрированы в ряде стран Азии, Африки, Европы и Америки, подозрительные на сап случаи были отмечены в этих же регионах, а также в России. Необходимость эпидемиологического мониторинга сапа в нашей стране продиктована возможностью завоза инфекции при импорте лошадей, контаминированных кормов и инвентаря из неблагополучных стран и потенциальной возможностью вспышки среди достаточно большого поголовья лошадей, являющихся основным резервуаром этой инфекции.

Поскольку возбудитель сапа высоко контагиозен, отсутствует вакцина для его профилактики, а летальность легочной формы у людей без лечения достигает до 95%, существует высокий риск заболевания у профессиональных контингентов – ветеринаров, животноводов, фермеров и сотрудников специализированных лабораторий, работающих с буркхолдериями. Известны восемь случаев заболевания сапом персонала военного исследовательского центра в Форт-Детрике, Мэриленд, США. Нельзя забывать также о том, что во время Первой и Второй мировых войн возбудитель сапа был использован в качестве агента биологического оружия и в последующем ряд стран осуществлял программы по его разработке.

Ввиду возможности завоза сапа возбудителя из-за рубежа и вероятности преднамеренного его использования как средства биологического терроризма молекулярно-эпидемиологический мониторинг *Burkholderia mallei* является актуальной задачей. Для возбудителя сапа отечественными и зарубежными исследователями предложены различные методы молекулярного типирования. Однако некоторые из них, например, MLST, оказались неэффективными, другие характеризовались низкой воспроизводимостью или технической сложностью. Поэтому диссертационное исследование Бондаревой О.С., имеющее целью

изучение variability генома и разработку типирования штаммов *B. mallei* на основе амплификации дифференцирующих регионов генома (DFR) и оптимизации мультилокусного анализа числа переменных тандемных повторов (MLVA) для определения генетической характеристики изолята, установления источника и предположительных путей заноса инфекции в случае возникновения вспышки сапа, является актуальным.

Разделы «Актуальность исследования» и «Степень разработанности темы» дают представление о современном состоянии изучаемой проблемы и подводят читателя к цели и задачам работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертантом вынесены на защиту четыре положения, экспериментальное обоснование которых последовательно описано в рукописи и публикациях по теме диссертации. Все шесть выводов основаны на достаточном объеме фактического материала и результатах исследования, выполненного с использованием современных бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность полученных результатов, которые соответствуют современным научным данным в области молекулярного типирования возбудителей инфекционных болезней, подтверждается статистической обработкой. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, вытекают из результатов исследований и подтверждены фактическим материалом. Научная новизна состоит в разработке способа внутривидового типирования на основе анализа DFR и сокращенной схемы MLVA возбудителя сапа, отличающихся высокой разрешающей способностью, низкой трудоемкостью и быстротой выполнения. Охарактеризована variability подобранных ДНК-мишеней, подтверждена их перспективность для разработки способов молекулярного типирования *B. mallei* методами DFR и MLVA. Научная новизна подтверждена десятью патентами на изобретение олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для типирования штаммов *B. mallei* методом амплификации DFR.

Практическая значимость результатов

Значимость работы заключается в получении новых данных о степени гомологии отдельных фрагментов генома у разных штаммов патогена, определении консервативных и переменных локусов исследуемых геномов *B. mallei* и создании коллекции нуклеотидных последовательностей, в различной степени присутствующих у разных штаммов *B. mallei*. Определены генетические профили коллекционных штаммов возбудителя сапа, которые дополнили их паспорта, внесены в электронный каталог геномных портретов патогенных

буркхольдерий и электронную базу данных «Коллекционные штаммы патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора». По результатам исследований разработаны методические рекомендации учрежденческого уровня внедрения «Генотипирование патогенных буркхольдерий на основе анализа дифференцирующих регионов ДНК», «Генотипирование патогенных буркхольдерий с использованием мультилокусного анализа количества вариабельных тандемных повторов», «Алгоритм применения генотипирующих систем для ускоренной внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий», «Генотипирование *Burkholderia mallei* с использованием мультилокусного анализа количества вариабельных тандемных повторов и анализа дифференцирующих фрагментов ДНК». Материалы диссертации используют сотрудники института в рамках учебных программ по первичной специализации и переподготовке специалистов при проведении практических занятий и чтении лекций на курсах повышения квалификации.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов.

Автором лично проведен анализ литературы, выполнено сравнение геномов возбудителя сапа *in silico*, найдены вариабельные локусы, сконструированы праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для амплификации DFR-локусов, обработаны результаты экспериментальных данных, разработаны способы типирования штаммов возбудителя сапа на основе амплификации дифференцирующих регионов генома и мультилокусного анализа числа вариабельных тандемных повторов, оценена генетическая гетерогенность исследуемых штаммов возбудителя сапа, подготовлены статьи, тезисы, оформлены патенты на изобретение, подготовлены материалы для представления результатов работы на ряде научных конференций. По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 3 статьи в периодических изданиях из «Перечня рецензируемых научных журналов», рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, и 10 патентов на изобретение.

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста, построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений и список использованной литературы из 214 источников, в том числе 40 отечественных и 174 иностранных авторов. Рукопись иллюстрирована 13 рисунками и 13 таблицами. Работа выполнена в рамках 6 плановых НИР ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность.

Во введении кратко охарактеризован возбудитель сапа и эпидемиологическая обстановка по этой инфекции в мире, анализ существующих методов генетического типирования *B. mallei*; определено направление исследования и обоснована его актуальность; сформулирована цель и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость; положения, выносимые на защиту, сведения об апробации, публикациях и структуре диссертации, соответствующие требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по этим пунктам.

Обзор литературы (глава 1) состоит из трех подразделов. В первом представлена общая характеристика *B. mallei* и его генома, дан сравнительный анализ геномов штаммов возбудителя сапа, сравнение возбудителей сапа и мелиоидоза. Второй подраздел описывает типирование возбудителей особо опасных инфекций методами, основанными на амплификации переменных локусов генома. Методы типирования штаммов *B. mallei* освещает третий подраздел, из которого видно, что метод анализа дифференцирующих регионов генома не разработан, а MLVA разработан для типирования возбудителя мелиоидоза, использовался также для типирования возбудителя сапа, но нуждается в оптимизации. В целом, достаточно обширный обзор литературы дает хорошее представление об изучаемой проблеме и определяет выбор направления диссертационного исследования.

Во второй главе описаны материалы и методы исследований. В ней приведен перечень из 14 штаммов *B. mallei* из коллекции института и 29 полногеномных последовательностей штаммов *B. mallei* из базы данных GenBank, описаны праймеры для амплификации VNTR-локусов, бактериологические, биологические методы, методы ПЦР-амплификации, секвенирования ДНК и молекулярного типирования, филогенетического, биоинформационного и статистического анализа. Раздел раскрывает современный методический арсенал, которым располагает автор.

Глава 3 описывает разработку метода типирования на основе анализа DFR *B. mallei*. Была сформирована рабочая коллекция переменных нуклеотидных последовательностей для выбора ДНК-маркеров, выбраны девять дифференцирующих фрагментов ДНК на обеих хромосомах возбудителя сапа и подобраны праймеры для их амплификации. Затем оптимизированы параметры ПЦР и сконструированы экспериментальные наборы реагентов для генотипирования штаммов возбудителя сапа методом дифференцирующих регионов генома с электрофоретическим и гибридно-флуоресцентным учетом результатов «Амплиген *Burkholderia mallei* DFR-тип-ЭФ» и «Амплиген *Burkholderia mallei* DFR-тип-РВ. В завершение главы проведено типирование методом DFR штаммов *B. mallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-

исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, определены их генетические профили и установлено, что разработанный способ позволяет разделять *B. mallei* на DFR-типы, которые согласуются с регионом происхождения большинства штаммов, с высокой разрешающей способностью.

Глава 4 посвящена использованию MLVA для генотипирования штаммов *B. mallei*.

Проанализировав 32 VNTR-локуса известной схемы для типирования, Ольга Сергеевна остановилась в окончательном варианте на 6 локусах, отличающихся высокой полиморфностью. Предложенная схема была реализована амплификацией маркерных последовательностей в мультиплексных ПЦР с учетом результатов в формате фрагментного анализа с электрофорезом в полиакриламидном геле, капиллярного электрофореза и секвенирования ампликонов по Сэнгеру. Оценка генетического полиморфизма коллекционных штаммов *B. mallei* с помощью MLVA показала, что среди них отмечается генетическая гетерогенность, коррелирующая с географическим регионом происхождения большинства штаммов.

Проверка стабильности VNTR-локусов в процессе пассирования штаммов *in vivo* и после длительного использования в лаборатории с неоднократными пересевами выявила изменения в профиле штаммов *B. mallei*, свидетельствующие об их вариабельности и перспективности применения MLVA-типирования для клонального анализа возбудителя при возникновении вспышки.

В пятой главе диссертации оценена эффективность разработанных методов типирования. Методы анализа DFR и MLVA показали высокую дискриминирующую способность при внутривидовой дифференциации *B. mallei*. Кластеризация штаммов возбудителя сапа на основе MLVA согласовывалась с дифференциацией на основе DFR-типирования, а также с расположением штаммов на дендрограмме, построенной по результатам полногеномного анализа, и имела взаимосвязь с географическим регионом происхождения штаммов. Установлено, что сочетанный анализ на основе двух разработанных молекулярно-генетических подходов позволяет снизить вероятность ошибок, вызванных гомоплазией.

В главе «Заключение» автор обобщает итоги исследования, анализирует полученные результаты и сопоставляет их с данными других авторов, констатируя, что разработанные методические подходы внутривидовой дифференциации *B. mallei* можно рекомендовать для осуществления эпидемиологического и эпизоотологического надзора за сапом, а также при выявлении случаев сапа на территории Российской Федерации для оперативного определения генетической характеристики штамма, установления источника инфекции, исследования путей заноса и распространения сапа.

Шесть выводов логично основываются на полученных результатах, не вызывают сомнения в их достоверности и находятся в соответствии с намеченными задачами и вынесенными на защиту положениями. Диссертация носит завершённый характер. Опубликованные по теме диссертации работы и автореферат полностью отражают ее содержание.

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

Представленная на отзыв диссертация Бондаревой Ольги Сергеевны на тему «Типирование штаммов возбудителя сапа на основе анализа тандемных повторов и дифференцирующих регионов генома» по специальности 03.02.03 – «микробиология» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук имеет очевидную практическую ценность, а ее автор проявила себя как состоявший квалифицированный исследователь. Диссертация написана хорошим научным языком и читается легко. Текст иллюстрирован информативными рисунками.

При анализе диссертационной работы возникли следующие **вопросы**:

1. Можно ли и как следует определить взаимоотношения штаммов и вероятный географический регион происхождения, если они по данным DFR-анализа и MLVA при филогенетической реконструкции отнесены к разным кластерам, например, на рисунке 12 (стр. 98) штамм SAVP1 по данным DFR-анализа находится в одном субкластере со штаммами BMQ (Индия) и 23344 (Мьянма), а в дендрограмме MLVA – в субкластере со штаммом 2002734306 (Великобритания)?
2. Почему при оценке эффективности разработанных способов генотипирования не проведено сравнение предложенной схемы MLVA-6 со схемой MLVA-23 для типирования *B. mallei* (Hornstra et al, 2009) по данным анализа тех же 43 штаммов, которые использованы для сравнения эффективности MLVA-6 и DFR-9?

Замечания:

1. В тексте нет упоминаний о существовании базы данных MLVAbank for Microbes Genotyping с разделом «Burkholderia» (on line доступ <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/883>), в котором имеются панели с 32, 23 и 7 VNTR-локусами и профилями 92 штаммов *B. mallei*. Между тем, ее использование позволяет сравнить полученные MLVA-профили исследуемых штаммов с имеющимися в базе профилями, поскольку в ней представлены все VNTR-локусы схемы автора диссертации, за исключением локуса 1217.
2. На дендрограмме (рисунок 12, Б, стр.98) и в нескольких таблицах обозначен штамм *B. mallei* **Bahreïn 1**, а на дендрограмме (рисунок 12, А, стр.98) – штамм **Bahreïn**

Однако указанные недостатки не умаляют достоинств диссертации и не влияют на ее положительную оценку в целом.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней».

Диссертация Ольги Сергеевны Бондаревой выполнена на современном методическом уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи – совершенствование методов молекулярного типирования штаммов *B. mallei*, имеющей значение для развития молекулярно-эпидемиологического мониторинга сапа. Рецензируемая работа соответствует пунктам 1 – 4 паспорта специальности 03.02.03 «микробиология», что обосновано целью, задачами, положениями, вынесенными на защиту, полученными результатами и выводами. По актуальности поставленной проблемы, методическому уровню ее решения, теоретической и практической значимости результатов диссертация соответствует критериям пунктов 9, 10, 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней» от 23.009.2013 г. №842, утвержденного Правительством Российской Федерации (в редакции постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Ольга Сергеевна Бондарева заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 «микробиология».

Официальный оппонент:

Док. мед. наук, профессор,
главный научный сотрудник
лаборатории сибирской язвы
Федерального казенного
учреждения здравоохранения
«Ставропольский научно-
исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия
человека

/Евгений Иванович Еременко/

20.08.2019 г.

355035 г. Ставрополь, ул. Советская 13-15, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. E-mail: ejer@mail.ru, тел. +79614549625

Подпись Еременко Е.И. заверяю.
Ученый секретарь ФКУЗ
Ставропольский противочумный
институт Роспотребнадзора
канд. биол. наук



Татьяна Леонидовна Красовская