

## ОТЗЫВ

**на автореферат диссертации Ульшиной Дианы Васильевны  
«Выявление и межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза с  
использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии», представленной на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальностям  
03.02.03 – микробиология**

Бруцеллез - это зооноз, который остается важной проблемой общественного здравоохранения на обширных территориях большинства континентов. Не составляют исключения регионы Российской Федерации такие, как Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа. Поэтому остается актуальным своевременное выявление и идентификация бруцелл с использованием как классических методов: бактериологические и иммунологические (трудоемкие, продолжительные по времени), так и молекулярно-биологических: ПЦР и другие методы амплификации, масс-спектрометрические. По данным ряда авторов применение протеомных технологий на основе MALDI-TOF масс-спектрометрии позволяет за короткий срок с высокой точностью определить принадлежность выделенной культуры к роду *Brucella* spp. Однако отмечена вариативность дискриминирующей способности данного метода при видовой идентификации бруцелл (Ferreira L. *et al.*, 2010; Lista F. *et al.*, 2011; Silva D. *et al.*, 2020). Остаются нерешенными вопросы выявления возбудителя бруцеллеза в пробах клинического материала с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя. В связи с изложенным, диссертационная работа Ульшиной Д.В., направленная на адаптацию метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для выявления и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, несомненно, актуальна.

Для достижения поставленной цели Диана Васильевна решает задачи по следующим направлениям:

- сформировать коллекцию штаммов *Brucella* spp. разного таксономического положения с целью исследования вариативности белковых профилей бактериальных экстрактов культур возбудителя методом времяпролетной масс-спектрометрии;
- создать электронную базу референсных масс-спектров штаммов бруцелл в среде программы Biotyper (Bruker Daltonics, Германия);
- разработать алгоритм анализа клеточных белков для идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии;
- изучить зависимость основных параметров масс-спектров от питательных сред и условий культивирования возбудителя бруцеллеза при исследовании методом MALDI-TOF MS;
- обосновать экспериментальную возможность индикации *Brucella* spp. в модельных гемокультурах без выделения чистой культуры или накопления возбудителя с помощью времяпролетной масс-спектрометрии;
- дать характеристику масс-спектров экстрактов крови биопробных животных при экспериментальном бруцеллезе с использованием современных программных пакетов в среде языка программирования «R»;
- разработать эффективный алгоритм биоинформационного анализа, позволяющий проводить межвидовую дифференциацию *Brucella* spp. на основании анализа белковых профилей возбудителя;



- провести исследование особенностей масс-спектрометрических профилей крови больных бруцеллезом людей с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией для специфической индикации *Brucella* spp.

На первом этапе работы автором разработан алгоритм анализа клеточных белков для идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для этого была осуществлена модификация метода обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза. Показано, что предложенный способ обеззараживания не оказывает влияния на качество масс-спектров. Представляется необходимым уточнить концентрацию используемых для анализа бактериальных суспензий бруцелл и их количество, которое смешивается с 900 мкл 95% этилового спирта (в автореферате такие сведения не представлены). Далее была выбрана оптимальная среда для культивирования бруцелл для масс-спектрометрического анализа - агар Альбими, определены оптимальные значения характеристик валидного масс-спектра при анализе культур *Brucella* spp.

У выращенных на этой среде 96 штаммов бруцелл (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*) были определены белковые спектры, которые при кластеризации с использованием программы «MALDI Biotyper» показали сходства у разных видов бруцелл. Наибольшую близость проявляли масс-спектры штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*, масс-спектры *B. ovis* и *B. suis* формировали смешанные подгруппы, как и масс-спектры *B. canis* и *B. neotomae*. Полученная кластеризация не в полной мере соответствует классической таксономии, но автор считает, что метод может быть использован для индикации и внутривидовой дифференциации возбудителя бруцеллеза. Несколько другие данные были получены при использовании пакета «RGL» в среде языка программирования «R» для интерпретации результатов MALDI-TOF MS. В этом случае дифференциация штаммов бруцелл находилась в соответствии с их таксономическим положением, что указывает на перспективность дальнейшего применения предложенного подхода при идентификации видов бруцелл с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Анализируя спектры белковых экстрактов штаммов *Brucella* spp., автор определила группу родоспецифичных пиков: 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 5036, 4545, 4770, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068 и пики, уникальные для *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*. При сравнении выявленных пиков с белковыми профилями возбудителей инфекций с похожей симптоматикой (*Coxiella burnetii* и *Yersinia pseudotuberculosis*) подтверждена специфичность выявленных для *Brucella* spp. маркеров.

На втором этапе была проведена оценка эффективности предложенного алгоритма выявления бруцелл методом MALDI-TOF MS в пробах крови, искусственно загрязненных штаммами *B. abortus* и *B. melitensis*. Была проведена сравнительная оценка MALDI-TOF MS супернатанта и лейкоцитарной фракции модельных образцов крови. Установлено, что оптимальным для выявления *Brucella* spp. является использование лейкоцитарной фракции крови. Основное количество пиков на масс-спектрах загрязненных образцов крови человека определялось в интервале 2300 – 16100 Да. Специфичными для бруцелл оказались пики: 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 6672, 7048, 9085. Был сделан вывод о том, что метод позволяет достоверно дифференцировать кровь условно здорового человека и загрязненную возбудителем бруцеллеза. Изучалось ли влияние разных групп крови людей на вариативность белковых спектров, как при искусственной загрязнении образцов крови, так и при исследовании крови больных бруцеллезом людей? Проводилась



ли контаминация образцов крови возбудителями инфекций, с клинической картиной похожей на бруцеллез (например, *Y.pseudotuberculosis*), и если да, то были ли обнаружены общие пики в белковых спектрах лейкоцитарных фракций, контаминированных этими возбудителями и возбудителем бруцеллеза?

На следующем этапе исследований были изучены белковые профили экстрактов крови биопробных животных с экспериментальным бруцеллезом. Выявлены общие пики ( $m/Z \pm 5$  Да) (2250, 2581, 3025, 3640, 3696, 3754, 4545, 6672, 7905, 8351, 14504), пять из которых (2250, 3640, 7905, 8351, 14504), Диана Васильевна ассоциирует с протеканием инфекционного процесса в организме больного бруцеллезом животного. Методом РСА показано, что распределение образцов на основе масс-спектров полностью соответствует видовой принадлежности используемых в эксперименте штаммов. Предыдущие эксперименты обнаружили 17 фрагментов, специфичных для шести видов возбудителя, лишь шесть из которых выявлены в крови мышей. Автор связывает это с обратимым образованием комплексов соответствующих компонентов с белками крови, которые могут удаляться в процессе пробоподготовки.

Особый интерес представляет сравнение белковых спектров крови людей больных бруцеллезом со спектрами крови условно здоровых людей и культур *Brucella* spp. Определена высокая вариабельность параметров основных сигналов для всех образцов от больных людей. В тоже время, семь пиков позиционируются, как специфические для бруцелл ( $m/Z \pm 5$  Да): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, позволяющие различать масс-спектры условно здоровых людей от больных бруцеллезом без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце с чувствительностью 90,48 %, специфичность 96,3 %, точность – 94,67 % при вероятности 0,95. Проведенные исследования позволили разработать биоинформационный анализ MS данных с помощью среды языка программирования «R», с помощью которого можно различать образцы крови больных бруцеллезом и условно здоровых людей.

Основными итогами проведенной работы, несомненно, являются создание открытой пополняемой электронной базы референсных белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза, полученных с использованием метода MALDI-TOF MS, на основе коммерческой платформы «BioTyper» («Bruker Daltonics», Германия), разработка схемы идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS, определение возможности выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови больных с острой формой заболевания методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце на стадии пробоподготовки.

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 20 опубликованных работах, пять из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Материалы работы нашли применение при подготовке двух электронных баз данных: «База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper» (ФИПС № 2017621336, от 20.11.2017 г., Приложение А) и «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы «MALDI Biotyper» (ФИПС № 2016620345, от 15.03.2016 г., Приложение Б), двух методических рекомендаций, утвержденных директором ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.



Таким образом, диссертационная работа Ульшиной Дианы Васильевны «Выявление и межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии» посвящена актуальной проблеме, выполнена на большом материале с использованием современных молекулярно-биологических подходов, полученные результаты имеют новизну, теоретическую и практическую значимость, могут быть использованы для совершенствования приемов видовой и внутривидовой идентификации штаммов возбудителя бруцеллеза. Диссертационная работа соответствует критериям "Положения о порядке присуждения ученых степеней" пп. 9, 10, 11 и 13, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации N 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор Ульшина Диана Васильевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология.

Заведующая отделом микробиологии  
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

Осина Наталия Александровна

Старший научный сотрудник  
лаборатории диагностических технологий  
Федерального казенного учреждения  
здравоохранения Российский  
научно-исследовательский  
противочумный институт "Микроб"  
Федеральной службы по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
кандидат медицинских наук

Булгакова Елена Германовна

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

Подписи Н.А. Осиной и Е.Г. Булгаковой ЗАВЕРЯЮ

Начальник отдела кадров  
ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб"  
Роспотребнадзора



О.В. Шумигай