

На правах рукописи

Ульшина Диана Васильевна

**ВЫЯВЛЕНИЕ И МЕЖВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ
ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MALDI-TOF
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Оболенск
2020

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Куличенко Александр Николаевич, член-корреспондент Российской академии наук Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Официальные оппоненты: Викторов Дмитрий Викторович, доктор биологических наук, доцент (специальность 03.02.03 – микробиология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по научной и экспериментальной работе, г. Волгоград

Припутневич Татьяна Валерьевна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии, г. Москва

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Нижний Новгород

Защита состоится «18» декабря 2020 г. в 13 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 350.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Бруцеллез - один из самых значимых и распространенных зоонозов, вызывающий значительную заболеваемость в популяциях крупного и мелкого рогатого скота, а также среди людей [Mogaka, 2015; Mirnejad, 2017]. В Российской Федерации к наиболее эпидемиологически неблагополучным по бруцеллезу относятся Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа, на долю которых приходится от 70 до 90 % случаев заболеваний бруцеллезом в стране [Пономаренко, 2018].

Ввиду большой эпидемиологической значимости патогена, выделение культуры *Brucella* spp., а также ее идентификация с определением видовой принадлежности имеет важное значение при проведении лабораторной диагностики бруцеллеза [МУК 3.1.7.3402-16]. Регламентированные методы видовой идентификации, основанные на изучении фенотипических свойств, позволяют дифференцировать возбудителя бруцеллеза до уровня биовара, но характеризуются трудоемкостью, длительностью и, в ряде случаев, неспецифичностью анализа [H. Jiang et al., 2015], а также требуют проведения работ с живыми культурами возбудителя.

Времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) является современным экспресс-методом детекции и дифференциации микроорганизмов, обеспечивающим прямой анализ белковых экстрактов микробной клетки, что повышает эффективность лабораторной диагностики инфекционных болезней [Grunow et al., 2016; Lasch et al., 2015]. Чувствительность метода MALDI-TOF MS для разных патогенов составляет $n \cdot 10^3 - 10^6$ м.к./мл, что позволяет проводить индикацию и идентификацию микроорганизмов.

К настоящему моменту использование MALDI-TOF MS в лабораторной диагностике инфекций сводится к сравнению полученных белковых профилей с базой данных референсных масс-спектров (например, пакет программ BioTyper (Bruker Daltonics, Германия). Анализ видов и биоваров *Brucella* spp. в программе «MALDI BioTyper» позволил выявить ряд различий между полученными результатами и классической таксономией, основанной на фенотипических признаках [Karger, 2013]. Сложность проведения межвидовой дифференциации, например, для штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*, обусловлена в первую очередь близостью соответствующих масс-

спектров, что существенно затрудняет однозначную дискриминацию представителей этих видов [Sali et al., 2018].

Данные научных исследований свидетельствуют, что специфичность идентификации культур бруцелл методом MALDI-TOF MS варьирует в пределах от 90 % до 99,9 % [Sali et al., 2018]. Повышение эффективности идентификации микроорганизмов *Brucella* spp. возможно на основе выявления эволюционно консервативных основных рибосомных белков малой массы (2-20 кДа) – биомаркерных ионов. Важно отметить, что в этом диапазоне масс на масс-спектрах находятся сигналы, позволяющие проводить дифференциацию бруцелл на межвидовом/внутривидовом уровнях [Mesureur et al., 2018].

В свою очередь, обработка масс-спектров и обнаружение биомаркеров являются ключевыми этапами статистического анализа при решении широкого круга задач при интерпретации MALDI-TOF MS данных. Представляется интересным использование среды языка программирования «R» для анализа MS данных при исследовании возбудителя бруцеллеза [Daumas et al., 2018].

Использование MALDI-TOF MS для выявления возбудителей ООИ в клиническом материале на настоящий момент включает этап выделения культуры. Поэтому длительность и сложность работ по изоляции бруцелл из исследуемого материала значительно осложняют реализацию метода на практике [van Belkum et al., 2018]. В зарубежных публикациях приводятся данные о возможности использования крови и цереброспинальной жидкости в протеомном профилировании для диагностики инфекционных болезней [Angeletti et al., 2016]. При этом идентификация бактерий методом MALDI-TOF MS с помощью программного пакета BioTyper остается сложной задачей [Nyvang et al., 2010]. Низкие значения коэффициента совпадения (Score), полученного масс-спектра с референсными файлами из базы данных при анализе клинических образцов, могут быть обусловлены, в первую очередь, присутствием в исследуемом материале фракций небактериальных белков, существенно влияющих на качество масс-спектров.

Прямую идентификацию бруцелл в биоматериале методом MALDI-TOF MS, прежде всего, затрудняет вариабельность качественного и количественного состава белковых профилей различного клинического материала. Для преодоления этой проблемы совершенствуют методы пробоподготовки и биоинформационные алгоритмы

для интерпретации полученных данных [Guo J. et al., 2019; Torres I. et al., 2018]. Ускоренное выявление бруцелл методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или подращивания бактериальной массы на стадии пробоподготовки – перспективное востребованное направление совершенствования диагностики [Pei Wang et al., 2016].

Таким образом, в настоящее время внедрение MALDI-TOF масс-спектрометрии в систему лабораторной диагностики бруцеллеза требует разработки стандартизированных подходов к пробоподготовке, оценке и интерпретации полученных результатов.

Цель исследования – разработка методических подходов и алгоритмов анализа для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием биоинформационных технологий.

Задачи исследования:

1. Сформировать коллекцию штаммов *Brucella* spp. разного таксономического положения с целью исследования варибельности белковых профилей бактериальных экстрактов культур возбудителя методом времяпролетной масс-спектрометрии.

2. Создать электронную базу референсных масс-спектров штаммов *Brucella* spp. в среде программы Biotyper (Bruker Daltonics, Германия).

3. Разработать алгоритм анализа клеточных белков для идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии:

- оптимизировать методику обеззараживания и подготовки проб культур бруцелл для исследования методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией;

- выявить на масс-спектрах специфичные сигналы, поиск биомаркеров для межвидовой дифференциации *Brucella* spp.

4. Изучить зависимость основных параметров масс-спектров от питательных сред и условий культивирования возбудителя бруцеллеза при исследовании методом MALDI-TOF MS.

5. Обосновать экспериментальную возможность индикации *Brucella* spp. в модельных гемокультурах без выделения чистой культуры или накопления возбудителя с помощью времяпролетной масс-спектрометрии.

6. Дать характеристику масс-спектров экстрактов крови биопробных животных при экспериментальном бруцеллезе с использованием современных программных пакетов в среде языка программирования «R».

7. Разработать эффективный алгоритм биоинформационного анализа, позволяющий проводить межвидовую дифференциацию *Brucella* spp. на основании анализа белковых профилей возбудителя.

8. 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.

Научная новизна. Впервые создана электронная база референтных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза для идентификации и дифференциации изолятов *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*.

Впервые определены качественные и количественные характеристики масс-спектров в зависимости от используемой питательной среды с экспериментальным обоснованием применения агара Альбими при подготовке культур возбудителя бруцеллеза.

Впервые разработан алгоритм идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, включающий анализ совокупности сигналов, специфичных для представителей *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*.

Впервые разработана методика, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов, позволяющая проводить обеззараживание и пробоподготовку крови, подозрительной на инфицирование возбудителя бруцеллеза для анализа методом времяпролетной масс-спектрометрии.

Впервые показана возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или подращивания возбудителя в образце на стадии пробоподготовки. Охарактеризован комплекс аналитически значимых сигналов – биомаркеров, позволяющих проводить дифференциацию белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом от масс-спектров проб крови условно здоровых людей.

Показана эффективность использования среды языка программирования «R» в сочетании с ПО «Mass-Up» для комплексной биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии при индикации и идентификации *Brucella* spp.

Предложен алгоритм биоинформационного анализа MALDI-TOF MS данных в среде языка программирования «R», позволяющий дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей. Используемый комплекс программных средств позволил обеспечить два необходимых критерия качества дифференциации анализируемых объектов: компактность групп и их дискретность.

Теоретическая и практическая значимость. Создана пополняемая электронная база белковых профилей референсных штаммов и клинических изолятов возбудителя бруцеллеза (n=96), циркулировавших на территории Ставропольского края, Республик Дагестан, Ингушетия, Чечня, Кабардино-Балкария, Северная Осетия - Алания и Калмыкия «База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper» (ФИПС № 2017621336, от 20.11.2017 г., Приложение А). На основании анализа белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper DB Offline Classification с применением сформированной базы данных показана высокая эффективность применения метода MALDI-TOF MS для достоверной идентификации и типирования культур возбудителя бруцеллеза. – Федеральный уровень внедрения.

Масс-спектры бактериальных экстрактов 23 культур *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis* включены в электронную базу данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы «MALDI Biotyper» (ФИПС № 2016620345, от 15.03.2016 г., Приложение Б), которая может быть использована для идентификации и таксономической классификации изолятов возбудителя бруцеллеза до вида. – Федеральный уровень внедрения.

В лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора при выполнении диагностических исследований в рамках деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза и научной работе используются сведения из электронной базы белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper DB Offline Classification (II группа патогенности) для идентификации и дифференциации изолятов возбудителя (Акт внедрения №1 от 03.12.2018 г.)

Разработаны Методические рекомендации «Порядок подготовки и анализа проб крови, подозрительной на присутствие возбудителя бруцеллеза, при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией» (Одобрены ученым советом ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, утверждены директором института 30.09.2016 г., протокол № 9) и Методические рекомендации «Биоинформационный анализ масс-спектрометрических данных с использованием программных пакетов языка программирования «R» при исследовании проб крови больных или подозрительных по заболеванию бруцеллезом людей» (Одобрены ученым советом ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, утверждены директором института 26.09.2018 г., протокол № 6).

Методология и методы исследования. В соответствии с целью и задачами работы для исследования бактериальных взвесей культур *Brucella* spp., искусственно контаминированных возбудителем бруцеллеза проб крови от человека (модельные клинические образцы), крови инфицированных в условиях эксперимента мышей, проб клинического материала (кровь) от людей с острой формой заболевания использовали микробиологические и физико-химические методы. Оценку возможности детекции бруцелл в модельных клинических образцах крови условно здоровых людей проводили с помощью микроскопических методов. Межвидовую дифференциацию штаммов на основе белкового профилирования близкородственных видов бруцелл, дифференцирование образцов экспериментальной группы (масс-спектры крови больных бруцеллезом людей) от отрицательного контроля осуществляли с помощью статистических подходов (PCA, MDS).

Степень достоверности и апробация результатов работы:

1. Результаты диссертационной работы получены с использованием современного сертифицированного оборудования, микробиологических методов исследования с последующей статистической обработкой данных с применением программного обеспечения «Mass-Up» и прикладных пакетов в среде языка программирования «R».

2. Материалы диссертационной работы были представлены на VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь), VII Всероссийской научно-

практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (08-10 декабря 2015 г., г. Санкт-Петербург), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (05-06 апреля 2017 г., г. Ставрополь), IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (5-7 декабря 2017 г., г. Иркутск), X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (23-27 октября 2018 г., г. Москва), итоговых научно-практических конференциях ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (2015-2019 гг.).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 134 страницах компьютерного текста, содержит 2 таблицы и 29 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, включающих описание материалов и методов исследований и экспериментальную часть, заключения, выводов. Список литературы содержит 164 источника, из них: 34 – отечественных и 130 – зарубежных.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 20 научных работ, из них 5 в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, зарегистрированы 2 электронные базы данных.

Личный вклад автора и место выполнения диссертационной работы. Работа подготовлена на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора при выполнении НИР: «Совершенствование и внедрение методов идентификации и типирования патогенных биологических агентов на основе масс-спектрометрии» (№ гос. регистрации АААА-А16-116022510098-1). Автор участвовал в формулировании актуальности, цели и концепции исследования, в проведении сбора и анализа литературных данных в рамках проблематики, планировании и постановке экспериментов, апробации и внедрении использованных в работе технологий, обработке, анализе и интерпретации результатов, внедрении их в практику.

Благодарности. Глубокую благодарность автор выражает научному руководителю - член-корр. РАН, докт. мед. наук, профессору, директору Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав

потребителей и благополучия человека Куличенко А.Н. за консультативную поддержку и всевозможную помощь при выполнении работы. Отдельная признательность канд. хим. наук Ковалеву Д.А. за помощь в разработке концепции исследования, комплексный анализ и интерпретацию данных MALDI-TOF MS исследования. Особая благодарность коллективу лаборатории бруцеллеза за подготовку проб культур возбудителя бруцеллеза и клинического материала для MALDI-TOF исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Охарактеризован комплекс из 17 пиков, специфичных для шести видов бруцелл ($m/Z \pm 5$ Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 5036, 4545, 4770, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068; установлены общие сигналы для представителей каждого вида *Brucella* spp., которые могут быть использованы при межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза.

2. Разработанная «База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper» позволяет эффективно проводить идентификацию бруцелл в режиме реального времени методом MALDI-TOF MS.

3. Предложенный вариант MALDI-TOF MS анализа позволяет детектировать специфичные для бруцелл маркеры ($m/Z \pm 5$ Da): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, при прямом анализе материала (крови) от больных без этапа обогащения или культивирования возбудителя.

4. Разработанная методика пробоподготовки образцов крови для индикации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов посредством центрифугирования и отмывки с последующей обработкой раствором этилового спирта, обеспечивает как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов для выполнения анализа.

5. Алгоритм биоинформационного анализа MALDI-TOF MS данных в среде языка программирования «R» позволяет идентифицировать в белковых профилях образцов крови специфичные для бруцелл маркеры при исследовании материала от людей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты для исследования: бактериальные взвеси 96 культур *Brucella* spp., искусственно контаминированные возбудителем бруцеллеза пробы крови от человека (модельные клинические образцы), кровь инфицированных в условиях

эксперимента мышей, пробы клинического материала (кровь) от людей с острой формой заболевания.

Микробиологические методы. Этапы обеззараживания и белковой экстракции культур *Brucella* spp. проводили с учетом требований действующих санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», возбудитель бруцеллеза относится ко второй группе патогенности (опасности). Для оценки возможности детекции бруцелл в модельных клинических образцах крови условно здоровых людей использовали культуры двух видов возбудителя: *B. abortus* (21 штамм) и *B. melitensis* (5 штаммов). Диагностическую информативность метода MALDI-TOF MS для прямого выявления белковых маркеров бруцелл в биоматериале (кровь) исследовали при экспериментальном моделировании инфекции на мышах. В качестве клинического материала анализировали стабилизированную гепарином венозную кровь от 52 условно здоровых людей и 19 больных с острой формой бруцеллеза.

Микроскопические методы. Оценку эффективности алгоритма выявления возбудителя бруцеллеза в искусственно контаминированных образцах крови методом MALDI-TOF MS проводили с применением люминесцентного микроскопа Nikon Eclipse E200 (Япония).

Физико-химические методы. *Масс-спектрометрическое исследование.* Масс-спектры получали в диапазоне масс 2000–20000 Да. Для достижения гомогенности образцов и обеспечения высокой воспроизводимости ($\geq 95\%$) масс-спектров в качестве матрицы брали раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты.

Воспроизводимость белковых профилей исследованных образцов всех экспериментов была подтверждена серией повторных измерений (не менее 3-х). При проведении MS анализа проб, хранившихся до 3 суток при температуре минус 18 – 20 °С, изменений основных характеристик сигналов масс-спектров не выявлено. Все результаты подтверждены сериями экспериментов.

Статистические методы. Визуализацию полученных данных осуществляли в среде языка программирования «R», на основании данных кластерного анализа проводили выявление групп образцов, схожих по масс-спектрометрическим профилям. В качестве маркеров использовали сигналы, *p*-значение которых было

меньше 0,05 (URL: <https://www.sing-group.org/mass-up/manual>). Для установленных маркеров рассчитывали точность, чувствительность, специфичность и прогностическую ценность положительного диагноза.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании анализа литературных источников выбран способ обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза [Lista и соавт., 2011], который был модифицирован в ходе исследования: к бактериальной суспензии добавляют 900 мкл спирта этилового 95 %, смесь тщательно перемешивают, затем ее инкубируют при температуре 30 °С в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугируют в течение 10 мин при 12 000 об/мин с удалением супернатанта. Установили, что предложенный способ обеззараживания не оказывает влияния на качество масс-спектров.

При регистрации масс-спектров апробировали следующие соотношения матрица/образец: 0,5/1, 1/1, 2/1. Наилучшие результаты были достигнуты при равном соотношении компонентов.

Влияние состава различных сред, используемых при культивировании бруцелл, на качество масс-спектров экстрактов выращенных штаммов, полученных с использованием стандартизированной процедуры пробоподготовки, оценивали на примере анализа белковых экстрактов вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19ВА, полученных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре. Общее число идентифицированных пиков на масс-спектрах для штамма *B. melitensis* Rev-1, культивированных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре, составляло 77±3, 65±5 и 41±4 соответственно (рисунок 1). Для штамма *B. abortus* 19ВА, при использовании вышеуказанных питательных сред, суммарное количество сигналов составило 96±5, 89±4, и 52±4. Наибольшее количество сигналов было зарегистрировано на белковых профилях бруцелл, культивируемых на агаре Альбими, что обусловлено, на наш взгляд, максимальным ростостимулирующим эффектом субстрата. Интенсивность мажорных пиков на масс-спектрах в случае использования агара Альбими составляла: (a.i.) 35187±530, 48698±435, 54751±560, что существенно превосходило аналогичные сигналы для исследуемых образцов белковых экстрактов с использованием бруцеллагара (13810±240, 15035±310, 13845±295) и эритрит-агара (11281±150, 11692±220, 12877±200).

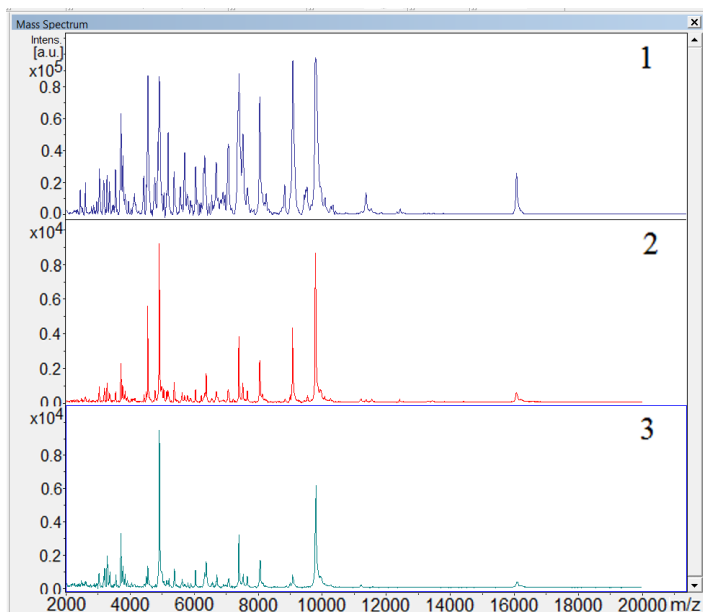


Рисунок 1 – MALDI-TOF MS профили белковых экстрактов вакцинного штамма *B. melitensis* Rev-1, полученных на агаре Альбими (1), бруцеллагаре (2) и эритрит-агаре (3)

Таким образом, применение агара Альбими в качестве питательной среды при культивировании бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.

Были определены оптимальные значения характеристик валидного масс-спектра при анализе культур *Brucella* spp.: интенсивность пиков $I > 500$, разрешение $R > 150$, общее число идентифицированных пиков от 65 до 100, отношение сигнал/шум – 15.

Сформирована база белковых профилей 96 штаммов *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*), которая может быть использована совместно с коммерческой «Bruker Daltonics».

При интеграции масс-спектров культур *Brucella* spp. в программный пакет «MALDI Biotyper» для 100 % исследованных коллекционных штаммов бруцелл проведена достоверная идентификация до рода и 97 % до вида.

Кластерный анализ полученных данных с использованием «MALDI Biotyper» позволил наглядно отобразить сходство белковых профилей представителей разных видов бруцелл. Масс-спектры штаммов *B. abortus* и *B. melitensis* характеризовались как наиболее близкие, поэтому однозначно их дифференцировать представлялось затруднительным. При этом штаммы *B. abortus* и *B. melitensis* располагались в чередующихся соседних кластерах, что подтверждает близкое родство этих видов (рисунок 2). Представители вида *B. suis* образовывали смешанные подгруппы со штаммами *B. ovis*. Виды *B. canis* и *B. neotomae* также не были разделены по группам. Несмотря на то, что построенная кластеризация не в полной мере соответствовала

классической таксономии, данное ПО позволяет проводить успешную индикацию культур возбудителя бруцеллеза и дифференциацию его видов.

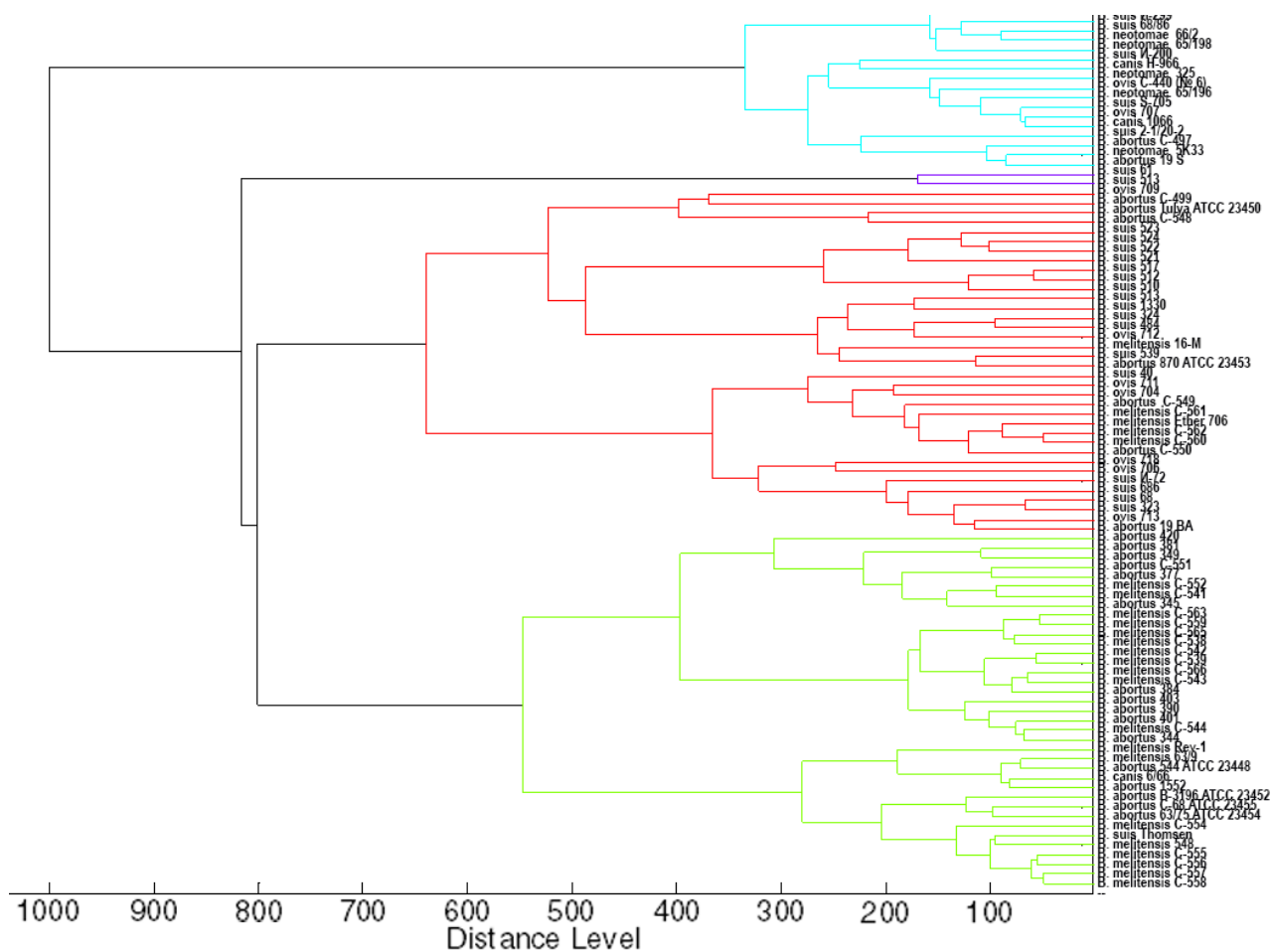


Рисунок 2 – Фрагмент MSP-дендрограммы масс-спектров *Brucella* spp.

Относительно малые дистанционные расстояния на 3D визуализации между кластерами штаммов в пределах одного вида бруцелл были получены при использовании пакета «RGL» в среде языка программирования «R» для интерпретации MALDI-TOF MS данных (рисунок 3).

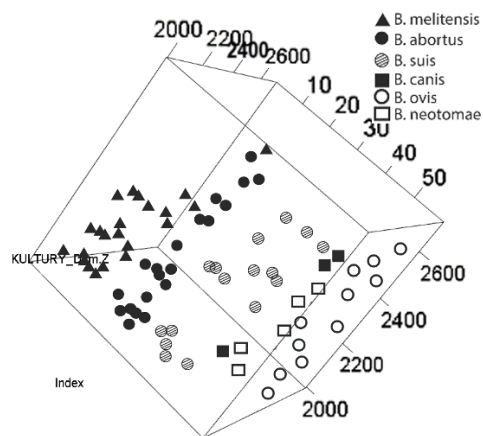


Рисунок 3 – 3D диаграмма рассеяния, полученная с помощью пакета «RGL» в среде языка программирования «R»

В построенной системе координат наблюдалось объединение представителей *B. abortus* и *B. melitensis* в отдельно расположенные самостоятельные группы. Штаммы вида *B. suis* располагались менее локализовано и наиболее близко относительно *B. canis*, что вполне согласуется с постулатом о дивергенции и генетической близости этих двух видов и их общем предке, отличном от остальных представителей этого рода [El-Sayed, 2018]. Наиболее удаленную группу составляли представители *B. ovis*. Использование пакета «RGL» в среде языка программирования «R» для интерпретации MALDI-TOF MS данных позволило дифференцировать штаммы возбудителя бруцеллеза в соответствии с их таксономическим положением.

В ходе анализа спектров белковых экстрактов всех штаммов *Brucella* spp. была установлена группа общих отличающихся по интенсивности пиков ($m/Z \pm 5$ Да): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 5036, 4545, 4770, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068, некоторые из которых описаны в работе Ferreira с соавт. (2010). Помимо родоспецифичных пиков, нами были отмечены уникальные маркеры для видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

Проведено сопоставление выявленных для бруцелл пиков с белковыми профилями возбудителей инфекций, характеризующихся схожими клиническими проявлениями, в частности: *Coxiella burnetii* [Shaw, 2004] и *Yersinia pseudotuberculosis* [Lasch, 2010]. Сравнительный анализ с данными зарубежных ученых позволил наглядно подтвердить специфичность выявленных нами для *Brucella* spp. маркеров, которые, на наш взгляд, могут быть использованы для специфичной детекции возбудителя в материале от больных.

На основании полученных результатов был разработан алгоритм идентификации культур *Brucella* spp. методом MALDI-TOF MS.

Была проведена оценка эффективности алгоритма выявления возбудителя бруцеллеза в искусственно контаминированных образцах крови методом MALDI-TOF MS, в качестве образца исследовали фракции лейкоцитов. Из каждой пробы крови условно здоровых людей параллельно готовили три образца в двух повторах: два из которых искусственно контаминировали культурами *B. melitensis* и *B. abortus* отдельно, 3 – отрицательный контроль. В результате инкубации бруцелл в образце при 37 °C в течение 48 ч достигалась необходимая концентрация бактериальных клеток для проведения MS анализа, которая составляла около 1×10^4 м.к./мл. На рис. 4

представлена микрофотография, иллюстрирующая фагоцитоз бруцелл в мазке крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза.

Для сравнительной оценки одновременно проводили MALDI-TOF MS анализ супернатанта и лейкоцитарной фракции модельных образцов крови. При этом было установлено, что пик-листы масс-спектров лейкоцитарной фракции, как правило, более представительны (в среднем на 20 ± 2 %), что может быть связано с чрезвычайно низкой концентрацией клеток возбудителя в полученном после центрифугирования супернатанте.

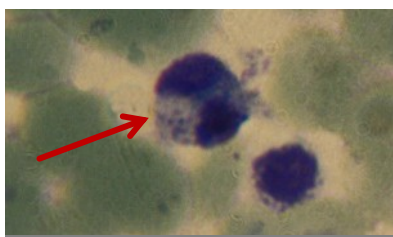


Рисунок 4 – Мазок крови, искусственно контаминированной возбудителем бруцеллеза. Фагоцитоз бруцелл (стрелка). Окраска азуром-II, $\times 1000$ (микроскоп Nikon Eclipse E200, Япония; окуляр – 10x (F.O.V. 20); объектив – 100 \times 1,25)

Основное количество пиков на масс-спектрах экстрактов образцов контаминированной возбудителем бруцеллеза крови человека локализовалось в интервале значений масс 2300 – 16100 Да и составляло 80 ± 10 . Белковые профили всех модельных образцов крови содержали общие сигналы ($m/Z \pm 5$ Да): **2422**, **2581**, **3025**, **3268**, **3336**, 3372, 3440, 3467, **3523**, **3696**, **3754**, 4410, **4545**, **4770**, **5036**, **5170**, 5360, 6217, 6284, 6345, **6672**, **7048**, 7394, 7513, 7567, 7765, 7938, **9085**, 15129, 16068 (курсивом выделены специфичные для представителей шести видов *Brucella* spp.).

Таким образом, было подтверждено, что использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции крови для выявления *Brucella* spp. в образцах крови методом MS является оптимальным. Охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать кровь условно здорового человека и контаминированную возбудителем бруцеллеза. По итогам данных эксперимента разработана схема пробоподготовки модельных клинических образцов крови, а в последующем и проб клинического материала, для их анализа методом MALDI-TOF MS.

Изучены профили белковых экстрактов крови биопробных животных, зараженных патогенными штаммами бруцелл. В ходе сравнительного анализа белковых профилей образцов отрицательного контроля были установлены общие фрагменты ($m/Z \pm 5$ Да): 2683, 2739, 2925, 3140, 3327, 4195, 4286, 5005, 5660, 6908, 7228,

7506, 11682, 14992, 15001. В ряде случаев области m/Z , содержащие сигналы, в том числе с высоким значением абсолютной интенсивности, совпадали с областями значений масс, в которых, как правило, регистрировались специфичные для представителей рода *Brucella* пики.

Анализ масс-спектров белковых экстрактов лейкоцитов крови инфицированных животных всех групп позволил выявить общие пики ($m/Z \pm 5$ Да): 2250, **2581**, **3025**, 3640, **3696**, **3754**, **4545**, **6672**, 7905, 8351, 14504 (курсивом отмечены маркеры *Brucella* spp.). Частота регистрации маркеров *Brucella* spp., отличающихся по абсолютной интенсивности, составила 0,98. Очевидно, что остальные 5 общих пиков могут быть ассоциированы с протеканием инфекционного процесса в организме больного бруцеллезом животного.

Можно заключить, что инфицирование модельных животных бруцеллами разных видов сопровождалось изменением соответствующих масс-спектров экстрактов крови, что в свою очередь приводило к появлению специфичных сигналов. При визуализации данных методом PCA, наблюдалось распределение проб крови искусственно инфицированных животных компактно и дискретно от крови мышей из группы отрицательного контроля – группа сравнения (рисунок 5).

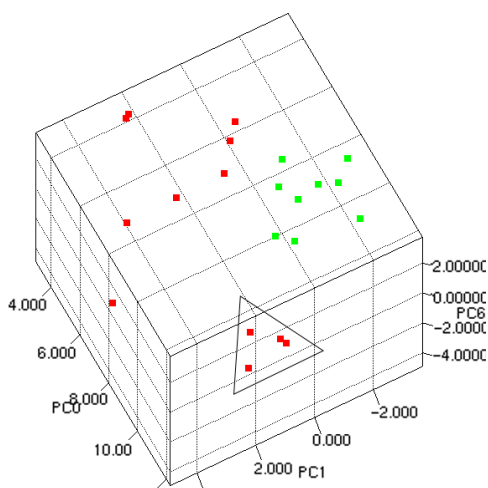


Рисунок 5 – Диаграмма распределения крови мышей, зараженных культурами *B. abortus* 544, *B. melitensis* 548 (красные маркеры) и *B. suis* 1330 (красные маркеры в треугольнике) и из группы сравнения (зеленые маркеры) на основании результатов анализа MS профилей методом PCA

Представленное распределение образцов на основании MS данных полностью отвечает видовой принадлежности используемых при заражении штаммов, что, вероятно, может быть следствием разного уровня экспрессии белков у трех видов бруцелл при инфекционном процессе. Исходя из ранее полученных данных, белковое профилирование культур *Brucella* spp. методом MALDI-TOF MS позволяет обнаружить 17 фрагментов, специфичных для шести видов возбудителя. В пробах крови мышей, искусственно инфицированных бруцеллами, наблюдается присутствие лишь 6 из

указанных сигналов, что может быть также следствием обратимого образования комплексов соответствующих компонентов с белками крови, которые могут удаляться в процессе пробоподготовки.

Выявление особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом проводили путем сравнительного анализа их со спектрами экстрактов крови условно здоровых людей и культур *Brucella* spp. Все масс-спектры экстрактов крови больных бруцеллезом включали отличающиеся по интенсивности общие пики ($m/Z \pm 5$ Да): 2085, **3268**, **3336**, 4025, 4124, 4156, 4252, 4516, **5360**, 5558, **6672**, 7147, 7566, 8311, 9824, 10039, 15132, 15873 (курсивом отмечены маркеры *Brucella* spp.). В то же время были отмечены сигналы, которые присутствовали только у 90 % образцов ($m/Z \pm 5$ Да): 2014, **2422**, 4156, 5499, 5940, 6860, **7048**, 7885. Остальные два сигнала **3696** и 4914 Да были выявлены лишь на 80 % масс-спектров проб крови больных бруцеллезом людей.

Белковые профили больных бруцеллезом людей содержали совокупность отсутствующих на масс-спектрах контрольной группы аналитически значимых сигналов ($m/Z \pm 5$ Да): 2014, 2085, **2422**, **3268**, **3336**, **3696**, 4025, 4124, 4156, 4252, 4516, 4914, **5360**, 5499, 5558, 5940, **6672**, 6860, **7048**, 7147, 7566, 7885, 8311, 9824, 10039, 15132, 15873 (курсивом отмечены маркеры *Brucella* spp.). Остальные общие сигналы нехарактерны для масс-спектров условно здоровых людей и культур *Brucella* spp. Очевидно, эти пики неспецифичны и могут быть ассоциированы в первую очередь с протеканием острых иммуно-воспалительных процессов в организме больного бруцеллезом.

Для каждого из указанных сигналов на масс-спектрах образцов клинического материала отмечалось существенное изменение количественных характеристик, по нашему мнению, возможно коррелирующее с концентрацией возбудителя в крови больного бруцеллезом. Однако при высокой вариабельности параметров основных сигналов во всех клинических образцах больных людей были выявлены маркеры *Brucella* spp. (получен положительный результат).

Комплекс из общих сигналов, из которых 7 являются специфичными для представителей *Brucella* spp. ($m/Z \pm 5$ Да): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, позволяет точно дифференцировать масс-спектры условно здоровых людей от больных бруцеллезом без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце (для вероятности 0,95: чувствительность – 90,48 %, специфичность – 96,3 %, точность – 94,67 %).

Дифференцирование образцов экспериментальной группы (масс-спектры крови больных бруцеллезом людей) от отрицательного контроля (масс-спектры условно здоровых людей: не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции) осуществляли на основании выявления аналитически значимых сигналов с помощью линейного дискриминантного анализа, с предположением, что корреляция между признаками (пиками) пренебрежимо мала. Наибольший вклад в дифференциацию масс-спектров на группы внесли маркеры ($m/Z \pm 5$ Да): 2014, 3268, 4914, 5940, 6672, 7566. Наименьшее влияние на классификацию объектов по группам оказали пики ($m/Z \pm 5$ Да): 4124, 4156, 5499, 7885, 8311, 15132, 15873.

Оценку значений расстояния между сформированными группами проводили по данным кластерного анализа. Образование объектами двух отдельных ветвей, полученное по результатам проведенной кластеризации, считали статистически достоверным, поскольку значение бутстреп-вероятности для каждой превышала 80 %. На данном этапе разработали биоинформационный анализ MS данных с помощью среды языка программирования «R», который позволяет дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей.

Таким образом, использование методики пробоподготовки крови, подозрительной на инфицирование бруцеллами в сочетании с разработанным нами биоинформационным подходом, позволяет выявлять совокупность общих сигналов, присутствие которых было установлено только на белковых профилях образцов крови больных бруцеллезом людей. Выявленные сигналы могут быть использованы в качестве диагностических маркеров при MALDI-TOF MS исследовании клинического материала, подозрительного на наличие возбудителя бруцеллеза.

Выводы

1. Охарактеризованы особенности штаммов *Brucella* spp. разного таксономического положения (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*) на основании анализа белковых профилей бактериальных экстрактов культур возбудителя методом времяпролетной масс-спектрометрии.

2. Впервые создана открытая пополняемая электронная база референсных белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза, полученных с использованием метода MALDI-TOF MS, на основе коммерческой платформы «BioTyper» («Bruker Daltonics», Германия).

3. Впервые разработана схема идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS, включающая следующие этапы:

- культивирование бруцелл на агаре Альбими согласно разработанной методике;
- обеззараживание образца раствором 70 % этанола и пробоподготовка культур в стандартизированных для *Brucella* spp. условиях;
- экстракция белковой фракции из бактериальной суспензии возбудителя раствором 70 % муравьиной кислоты и ацетонитрилом;
- регистрация суммарного масс-спектра образца на масс-спектрометре;
- контроль качества масс-спектров (нормализация интенсивности пиков, коррекция базовой линии, выравнивание m/Z пиков, обнаружение сигналов) с использованием специализированного ПО для анализа масс-спектрометрических данных (среда языка программирования «R» и «Mass-Up»), выявление аналитически значимых пиков.

4. Показана эффективность среды языка программирования «R» для биоинформационной обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии белковых экстрактов культур в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, имеющих клиническое значение: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

5. Экспериментально обосновано применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа.

6. Разработана методика обеззараживания и пробоподготовки крови, подозрительной на присутствие возбудителя бруцеллеза, для анализа методом времяпролетной масс-спектрометрии, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов для последующего исследования, что позволяет значительно повысить качество белковых профилей.

7. Впервые показана возможность 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. Установлено присутствие выявленных общих фрагментов для белковых профилей экстрактов лейкоцитов крови людей при остром бруцеллезе, в том числе 7 родоспецифичных для бруцелл ($m/Z \pm 5$ Да): 2422, 3268, 3336, 3696, 5360, 6672, 7048, позволяющих проводить точную дифференциацию масс-спектров

условно здоровых людей от больных бруцеллезом (для вероятности 0,95: чувствительность составила 90,48 %, специфичность – 100,00 %, точность – 97,26 %).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты могут быть использованы в качестве научной основы для разработки эффективного методического подхода для прямого выявления и идентификации возбудителя бруцеллеза в крови с использованием MALDI-TOF MS. Разработка и внедрение схемы детекции и экспресс-типирования бруцелл на основании данных MALDI-TOF MS может способствовать повышению эффективности противоэпидемических мероприятий при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

a.i.	- Абсолютная интенсивность сигнала
m/Z	- Соотношение массы иона к заряду
MALDI-TOF MS	- Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ ионизацией (от англ. «Time-Of-Flight Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization»)
MSP	- Супер-спектр (от англ. «Main Spectrum»)
PCA	- Метод главных компонент (от англ. «Principal Component Analysis»)
SCORE	- Коэффициент соответствия (от англ. «score Value»)
ООИ	- Особо Опасные Инфекции
ПО	- Программное Обеспечение

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:

1. **Ульшина, Д.В.** Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, О.В. Бобрышева, Г.И. Лямкин, А.А. Худолеев, Ю.В. Сирица, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 4. - С. 96-99. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

2. **Ульшина, Д.В.** Особенности масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза при подготовке культуры на разных питательных средах / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, А.М. Жиров, Н.В. Жаринова, А.А. Худолеев, О.И. Коготкова, В.И.

Ефременко, Н.И. Евченко, А.Н. Куличенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. - № 1. – С. 29-34. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

3. **Ульшина, Д.В.** Применение времяпролетной масс-спектрометрии для выявления возбудителя бруцеллеза в образцах крови в эксперименте / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова, Н.М. Швецова, Т.В. Таран, И.В. Кузнецова, А.М. Жиров, А.А. Хачатурова, И.Ю. Борздова, А.Н. Куличенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 4. – С. 9–17. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

4. **Ульшина, Д.В.** Применение времяпролетной масс-спектрометрии для диагностики бруцеллеза и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* spp. / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, О.В. Бобрышева, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова, Н.И. Ковалева, А.Н. Куличенко // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, № 4 (27). – С. 15–24. (Импакт-фактор РИНЦ 0,325)

5. **Ульшина, Д.В.** Масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов крови животных при экспериментальном бруцеллезе / Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова, Т.В. Бердникова, А.Ю. Евченко, О.В. Бобрышева, Ю.В. Сирица, С.В. Писаренко, А.М. Жиров, И.В. Кузнецова, Н.Г. Варфоломеева, А.Н. Куличенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 4. – С. 11–18. (Импакт-фактор РИНЦ 0,464)

Базы данных:

1. База данных РФ № 2016620345, от 15.03.2016. Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper / ...Воропаев В.В., Котенева Е.А., Еременко Е.И., Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Цыганкова О.И., **Ульшина Д.В.** и др. – Правообладатели: ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и др.

2. База данных РФ №2017621336, от 20.11.2017. База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper / **Ульшина Д.В.**, Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Бобрышева О.В. и др. – Правообладатель ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Публикации в других изданиях:

1. Ковалев, Д.А. Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов / Д.А. Ковалев, **Д.В. Ульшина**, И.В. Кузнецова // Бактериология. – 2018. – № 1. – С. 13–17.

Публикации в сборниках трудов и материалов научных конференций:

1. **Ульшина, Д.В.** Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации *Brucella* spp. / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, С.И. Головнева, Е.В. Чеботарева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международ. участием «Актуальные

вопросы обеспечения противоэпидемических мероприятий в зоне чрезвычайных ситуаций» // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2014. - № 25. – С. 111-113.

2. **Ульшина, Д.В.** Разработка алгоритма идентификации *Brucella* spp. с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии / Д. В. Ульшина, Д. А. Ковалев, С. И. Головнева, Г. И. Лямкин // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: матер. VI Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2014. – С. 112-113.

3. **Ульшина, Д.В.** Использование прямого белкового профилирования с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации и типирования *Brucella* spp. / Д. В. Ульшина, Д. А. Ковалев, С. И. Головнева, Н. И. Ковалева, В. В. Воропаев // Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. (28 мая 2014 г.) / под ред. Е.И. Ефимова. – Н. Новгород, 2014. – С. 123-127.

4. **Ульшина, Д.В.** Изучение особенностей белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза при культивировании на разных питательных средах / Ульшина Д.В., Ковалев Д.А. Худолеев А.А. // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: матер. междунар. конф. (23-24 июня 2015 г., Москва). – М., 2015. – С. 387-390.

5. **Ульшина, Д.В.** Сравнительный анализ результатов белкового профилирования культур возбудителя бруцеллеза при использовании различных питательных сред / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, А.Н. Куличенко // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: сб. тр. VII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, 08-10 декабря 2015 г. - СПб., 2015. – С.

6. **Ульшина, Д.В.** Определение маркеров возбудителя бруцеллеза в крови методом времяпролетной масс-спектрометрии / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко // Здоровье населения и среда обитания: матер. науч.-практ. конф. 20-я ежегод. Неделя медицины Ставрополя. – Ставрополь: Параграф, 2016. – С. 101–104.

7. **Ульшина, Д.В.** Выявление возбудителя бруцеллеза в крови методом времяпролетной масс-спектрометрии / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: матер. науч.-практ. конф., Новосибирск, 26–27 сентября 2016 г. – Новосибирск: АРЕАЛ, 2016. – С. 174–176.

8. **Ульшина, Д.В.** Поиск маркеров возбудителя бруцеллеза в крови с использованием метода MALDI-TOF MS / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: матер. VIII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Москва, 1–3 ноября 2016 г. – М.: Грифон, 2016. – С. 217–219.

9. **Ульшина, Д.В.** Изучение особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом людей с использованием MALDI-TOF MS / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных [Электронный ресурс]: материалы II Всероссийской научно-практической конференции / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2017. – С. 283–285

10. **Ульшина, Д.В.** Анализ результатов MALDI-TOF MS исследования проб крови больных бруцеллезом людей / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова // Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: матер. всеросс. науч.-практ. интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора / под ред. проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН Н.В. Зайцевой. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2017. – С. 246-249.

11. **Ульшина, Д.В.** Использование MALDI-TOF MS для выявления особенностей белковых профилей крови больных бруцеллезом людей: [по матер. XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», Москва, 16–17 ноября, 2017 г.] / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Д.В. Русанова // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 5. – С. 1027. (Импакт-фактор РИНЦ: 0,745)

12. Ковалев, Д.А. Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов / Д.А. Ковалев, **Д.В. Ульшина**, И.В. Кузнецова // Бактериология. – 2018. – № 1. – С. 13–17.

13. **Ульшина, Д.В.** Белковое профилирование экстрактов крови больных бруцеллезом людей методом MALDI-TOF MS / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, И.В. Кузнецова, О.В. Бобрышева, С.В. Писаренко, Д.Г. Пономаренко, Т.В. Бердникова, А.Н. Куличенко // Молекулярная диагностика 2018: сб. тр. международной науч.-практ. конф. (Минск, 27–28 сентября 2018 г.) / под ред. В.И. Покровского. – Минск: СтройМедиаПроект, 2018. – С. 533–534.

14. **Ульшина, Д.В.** Применение прикладных пакетов в среде языка R для биоинформационной обработки данных MALDI-TOF на примере *Brucella* spp. и *Bacillus anthracis* / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, О.В. Семенова, А.Г. Рязанова, Л.Ю. Аксенова, Е.И. Еременко, О.В. Бобрышева, И.В. Кузнецова, Ю.В. Сирица, А.М. Жиров, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко // Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ: матер. XIV Межгосударственной науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, 20–21 ноября 2018 г.). – Саратов: Амирит, 2018. – С. 386–388.