

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 18.12.2020 г. № 15
о присуждении Ульшиной Диане Васильевне, гражданину РФ, ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Выявление и межвидовая дифференциация штаммов
возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии»
по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 15.10.2020 г.,
протокол № 12 диссертационным советом Д 350.002.01 на базе Федерального
бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации,
Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, 142279, г.о. Серпухов,
Московская область, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Ульшина Диана Васильевна, 1981 г. рождения, в 2004 г.
окончила Биолого-химический факультет Государственного образовательного
учреждения высшего профессионального образования «Ставропольский
государственный университет» (ныне Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-
Кавказский федеральный университет» Министерства науки и высшего
образования Российской Федерации) по специальности «Органическая химия».
Работает научным сотрудником лаборатории биохимии Федерального
казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-
исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории биохимии Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – микробиология), профессор Куличенко Александр Николаевич, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор.

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,

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, Институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, директор,

дали положительные отзывы на диссертацию.

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, в своем положительном заключении, подписанном Соловьевой Ириной Владленовной, доктором биологических наук, доцентом, ведущим научным сотрудником - заведующей лабораторией микробиома человека и средств его коррекции, указала, что диссертационная работа

является самостоятельной законченной квалификационной работой, в которой, на основании проведенного исследования, решена актуальная научная задача – разработана и апробирована схема биоинформационного анализа для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, создан алгоритм выявления маркеров патогена в клиническом материале без выделения бактериальной культуры. Результаты научной работы представляют научную и практическую значимость для совершенствования лабораторной диагностики бруцеллеза. Диссертация и автореферат полностью соответствуют требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления РФ от 01.10.2018 г., с изм. от 26.05.2020 г.) предъявляемым к кандидатским диссертациям, а диссертант заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 35 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 20 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 5 работ, зарегистрированы 2 электронные базы данных. Общий объем работ – 5,6 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

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 // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2015. – № 4. – С. 96-99. РИНЦ ИФ=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 // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2016. – № 1. – С. 29-34. SCOPUS, РИНЦ ИФ=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 // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2017. – № 4. – С. 9–17. SCOPUS, РИНЦ ИФ=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 // Инф. Бол. Новос. Мнен. Обуч. – 2018. – Т. 7, № 4 (27). – С. 15–24. РИНЦ ИФ=0,325.

5. **Ульшина, Д.В.** Масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов крови животных при экспериментальном бруцеллезе / **Д.В. Ульшина**, 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 // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2019. – № 4. – С. 11–18. SCOPUS, РИНЦ ИФ=0,464.

На диссертацию и автореферат поступило **3** положительных отзыва без замечаний от: **(1)** д-ра мед. наук, профессора **Чесноковой Маргариты Валентиновны**, заведующей отделом научно-информационно-аналитического обеспечения Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, и канд. мед. наук **Шестопалова Михаила Юрьевича**, старшего науч. сотрудника отдела микробиологии чумы того же учреждения, г. Иркутск; **(2)** канд. биол. наук **Осиной Натальи Александровны**, заведующей лабораторией молекулярной диагностики Федерального казенного учреждения здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека, и канд. мед. наук **Булгаковой Елены Германовны**, старшего науч. сотрудника лаборатории диагностических технологий того же учреждения, г. Саратов; **(3)** кандидата медицинских наук

Кулакова Юрия Константиновича, заведующего лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, доцент Викторов Дмитрий Викторович является признанным специалистом в сфере микробиологии особо опасных инфекций и имеет научные публикации в области исследований, соответствующей кандидатской диссертации Ульшиной Д.В. (**Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2018. – N. 1. – С. 52-57; **Пробл. Мед. Микол.** – 2018. – Т. 20. – N. 2. – С. 128; **Клин. Лаб. Диагн.** – 2017. – Т. 62. – N. 5. – С. 316-318; 2016. – Т. 61. – N. 12. – С. 833-837; 2016. – Т. 61. – N. 8. – С. 502-507; **Вестн. Волгоградск. Гос. Мед. Универ.** – 2016. – N. 4 (60). – С. 114-117; **Усп. Мед. Микол.** – 2016. – Т. 16. – С. 37-41);

доктор медицинских наук Припутневич Татьяна Валерьевна является признанным специалистом в области микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Ульшиной Д.В. (**Акушер. Гинекол. Нов. Мнен. Обуч.** – 2020. – Т. 8. – N. 1 (27). – С. 22-29; **Клин. Лаб. Диагн.** – 2016. – Т. 61. N. 12. – С. 842-848; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2016. – N. 1. – С. 52-58; **Inf. Genet. Evol.** – 2016. – Т. 39. – С. 99-105).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения бактерий методом MALDI-TOF MS и опыта применения масс-спектрометрии при расследовании вспышек инфекционных заболеваний, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Ульшиной Д.В. (**Генет.** – 2016. – Т. 52. – N. 9. – С.1021-1028; **Инф. Иммуно.** – 2016. – Т. 6. – N. 3. – С.240; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2016. – N. 2. – С. 16-23; **Мед. Альманах.** – 2016. – N. 3. – С.36-39; 2017. – N. 4. – С.66-69; **Бактериол.** – 2017. – Т. 2. – N. 3. – С.100-101; 2017. – Т. 2. – N. 3. – С. 48; **Мед. Академ. Журн.** – 2017. – Т. 17. – N.

4. – С.49-51; **Эпидемиол Вакцинопрофил.** – 2019. – Т. 18. – N. 2. – С.52-61; **Соврем. Технол. Мед.** - 2019. – Т. 11. – N. 4. – С.126-13), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Ульшиной Д.В.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан методический подход для идентификации возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS и алгоритм биоинформационного анализа данных в среде языка программирования «R», позволяющий выявлять комплекс аналитически значимых сигналов – биомаркеров, с целью дифференциации белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом от масс-спектров проб крови условно здоровых людей;

предложена методика пробоподготовки крови, подозрительной на инфицирование возбудителем бруцеллеза для анализа методом времяпролетной масс-спектрометрии, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов и позволяющая проводить обеззараживание образца;

доказана возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS без этапа выделения культуры или подращивания возбудителя в образце на стадии пробоподготовки;

введены представления, характеризующие комплекс аналитически значимых сигналов, позволяющих проводить дифференциацию образцов крови больных бруцеллезом от проб крови условно здоровых людей методом времяпролетной масс-спектрометрии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что разработанный комплекс методических приемов пробоподготовки обеспечивает необходимое качество получаемых данных при исследовании культур возбудителя бруцеллеза и клинического материала (кровь) от людей с острой формой бруцеллеза методом MALDI-TOF MS и биологическую безопасность работ; экспериментально обосновано использование в качестве образца для белкового профилирования экстракта лейкоцитарной фракции крови; доказана диагностическая значимость 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 90,5 %, специфичность – 100 %, точность – 97,3 %);

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: микробиологических (культивирование бактерий, определение влияния питательных сред и условий культивирования на качественные и количественные характеристики масс-спектров, получение модельных клинических образцов крови, инфицирование мышей бруцеллами в условиях эксперимента, подготовка проб клинического материала (кровь) от людей с острой формой заболевания), физико-химических (экстракция белков из бактериальных взвесей и проб крови), микроскопических (оценка возможности детекции бруцелл в модельных клинических образцах крови) и статистических (с применением пакета программ Microsoft Excel и алгоритмов PCA, MDS);

изложены методические подходы, использованные для исследования культур *Brucella* spp., искусственно контаминированных возбудителем бруцеллеза проб крови человека (модельные клинические образцы), крови инфицированных в условиях эксперимента лабораторных животных, проб клинического материала (кровь) от людей с острой формой заболевания методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, показана эффективность разработанного альтернативного биоинформационного подхода для интерпретации полученных масс-спектрометрических данных;

раскрыты особенности белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза в исследуемом диапазоне m/Z в пределах рода *Brucella* и для каждого из 6 видов, выявлена группа уникальных сигналов, общая для представителей *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. Neotomae* и *B. canis*, которая была использована для специфичной детекции возбудителя бруцеллеза в материале от больных;

изучены качественные и количественные характеристики масс-спектров в зависимости от используемой питательной среды на примере анализа

белковых экстрактов вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19 VA, полученных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре;

проведена оптимизация и стандартизация методики обеззараживания и подготовки проб культур *Brucella* spp. для анализа методом MALDI-TOF MS.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены пополняемые электронные базы белковых профилей референсных штаммов и клинических изолятов возбудителя бруцеллеза «База референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза в среде программы MALDI BioTyper» (ФИПС № 2017621336, от 20.11.2017 г.) и «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы «MALDI Biotyper» (ФИПС № 2016620345, от 15.03.2016 г.) – используемые в рамках деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза и научной работе лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» (Акт внедрения № 1 от 03.12.2018 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

определены оптимальные методические подходы, позволяющие выявлять специфичные маркеры возбудителя бруцеллеза в крови больных с острой формой заболевания методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры;

созданы научно обоснованные методические рекомендации по биоинформационному анализу масс-спектрометрических данных с использованием программных пакетов языка программирования «R» при исследовании проб крови больных бруцеллезом людей;

представлены алгоритм идентификации культур возбудителя бруцеллеза и общая методологическая схема прямого выявления бруцелл в крови с использованием MALDI-TOF MS.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

идея диссертационного исследования об изучении возможности применения времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией для специфической индикации *Brucella spp.* в экспериментах с гемокультурами и пробами клинического материала (кровь) опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению эффективности использования MALDI-TOF MS в вопросах идентификации и дифференциации бруцелл;

установлено частичное совпадение полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, в части - изучение эффективности алгоритма выявления бруцелл в модельных образцах крови, основанного на определении бруцелла-специфичных биомаркеров в белковых экстрактах с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии, вместе с тем, описанная методика была существенно переработана, было экспериментально подтверждено, что использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции представляется более предпочтительным по сравнению с супернатантом при выявлении возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS;

использованы современные методы получения и обработки информации, анализ и визуализацию данных проводили с использованием: программных пакетов языка программирования «R», «Mass-Up» и Excel 2010.

Личный вклад соискателя состоит в:

проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы, разработка стандартизированного алгоритма идентификации и дифференциации чистых культур бруцелл методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, оптимизация методики пробоподготовки культур бруцелл для получения качественных масс-спектрометрических данных, выбор оптимальной питательной среды для культивирования, анализ полученных белковых профилей бруцелл с использованием стандартного программного обеспечения MALDI Biotyper и пакета биоинформационного анализа RGL в среде языка программирования «R», разработка технологии детекции штаммов *Brucella spp.* в образцах биологического происхождения с использованием

MALDI-TOF MS; анализ методом масс-спектрометрии искусственно контаминированных культурами бруцелл образцов крови человека, анализ результатов эксперимента по изучению масс-спектров крови лабораторных животных с искусственным бруцеллезом, определение комплекса аналитически значимых сигналов, обуславливающих дифференциацию белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом и условно здоровых людей, разработка метода индикации возбудителя бруцеллеза в образцах крови людей, а также в личном участии в апробации результатов исследования, обработке, оформлении и публикации результатов.

На заседании 18.12.2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Ульшиной Д.В. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **19** человек, из них **8** докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология, участвовавших в заседании, из **22** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **18**, против **1**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель

диссертационного совета

профессор, д.м.н., академик РАН

(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь

диссертационного совета

к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 18.12.2020 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.