

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

комиссии диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора по кандидатской диссертации Ульшиной Дианы Васильевны на тему: «Выявление и межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии», выполненной в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Соответствие соискателя ученой степени требованиям, необходимым для допуска к защите. Ульшина Д.В. соответствует требованиям, изложенным в п. 3 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г.: имеет высшее образование, подтвержденное дипломом Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ставропольский государственный университет» по специальности «Органическая химия»; выполнила диссертационную работу на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, давшем положительное заключение по данной диссертации; сдала кандидатские экзамены, о чем предоставлена справка.

Соответствие диссертации специальности, по которой совету предоставлено право защиты. Диссертация Ульшиной Д.В. выполнена в лаборатории биохимии в рамках научной тематики Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, под руководством директора ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Куличенко Александра Николаевича на современном научно-методическом уровне с использованием микробиологических, физико-химических и статистических методов исследования, а также люминесцентной микроскопии. Члены комиссии считают, что диссертация Ульшиной Д.В. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.10.2018), предъявляемым к кандидатским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», а также паспорту специальности 03.02.03 – микробиология в областях исследований по пункту 2 – выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором. Выполнение требований к публикации основных научных результатов

диссертации. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из них: 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 1 работа - в рецензируемом научном журнале, 14 работ – в сборниках трудов и материалов научных конференций и зарегистрированы 2 электронные базы данных, что является вполне достаточным для проведения ее защиты. Автор самостоятельно провела информационный поиск, анализ литературных источников. Вместе с научным руководителем сформулировала цель и задачи работы, проанализировала и обобщила полученные результаты.

Все микробиологические и физико-химические методы исследования по созданию электронных баз референсных масс-спектров штаммов бруцелл, разработке алгоритма анализа клеточных белков для идентификации, изучения зависимости параметров масс-спектров от использованных питательных сред и условий культивирования возбудителя бруцеллеза при исследовании методом MALDI-TOF MS; микроскопические методы для экспериментального обоснования возможности индикации *Brucella* spp. в модельных гемокультурах без выделения чистой культуры, характеристике масс-спектров экстрактов крови биопробных животных при экспериментальном бруцеллезе с использованием современных программных пакетов в среде языка программирования «R»; статистический биоинформационный анализ для межвидовой дифференциации *Brucella* spp., исследование особенностей масс-спектрометрических профилей крови больных бруцеллезом людей с использованием времяпролетной масс-спектрометрии для специфической индикации бруцелл и описание полученных результатов проведены автором самостоятельно. Автор непосредственно принимала участие в подготовке и написании научных публикаций по теме диссертации.

Присвоения авторства чужого научного труда (плагиата), результатом которого может быть нарушение авторско-правового и патентного законодательства, в данной диссертации не обнаружено.

Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, изложение полученных результатов и заключение, выводы, практические рекомендации, список цитируемой литературы, содержащий 164 источника, в том числе – 130 зарубежных.

Актуальность выбранной темы определяется тем, что бруцеллез – особо опасный зооноз, широко распространенный в мире и актуальный в Российской Федерации. Высокая заболеваемость домашних животных и частота заражения людей с хронизацией инфекции и последующей инвалидизацией, сравнительная сложность и невысокая эффективность лабораторной диагностики диктуют необходимость совершенствования ее методов. Среди них в последнее время все большее распространение и признание приобретает метод времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI TOF MS), отличающийся методической простотой и скоростью проведения. Критическим для корректной идентификации патогенов этим методом является наличие представительной

базы референсных масс-спектров штаммов возбудителя, которые существуют для многих бактерий, но в случае с бруцеллами таких баз в коммерческих программных продуктах нет. Другая сложность масс-спектрометрической идентификации бруцелл до вида состоит в высоком сходстве спектров отдельных видов. Несмотря на быстроту выполнения MALDI TOF масс-спектрометрии, постановка ее требует наличия чистой культуры, время выделения которой для бруцелл может составлять несколько суток. До сих пор метод масс-спектрометрической детекции бруцелл непосредственно в исследуемом материале, в частности, в крови больных, не разработан, будучи весьма востребованным в лабораторной диагностике бруцеллеза.

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

Научная новизна полученных результатов заключается в том, что 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* и *B. canis*. Впервые разработана методика, включающая процедуру получения суспензии лейкоцитов, позволяющая проводить обеззараживание и пробоподготовку крови, подозрительной на инфицирование возбудителем 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 подрачивания 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. На основе полученных результатов исследования зарегистрированы две базы данных (РФ № 2016620345, от 15.03.2016 г. и РФ №2017621336, от 20.11.2017 г.)

