

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ННИИЭМ

им. академика И.Н. Блохиной

Роспотребнадзора, д.м.н., профессор

Е.И. Ефимов

« 9 » *ноября* 2020 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ НАУЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального бюджетного учреждения 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, на диссертационную работу Ульшиной Дианы Васильевны по теме «Выявление и межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования

Бруцеллез – особо опасная зоонозная инфекция, характеризующаяся полиорганной патологией с высокой частотой хронизации процесса и инвалидизации заболевших. Совершенствование лабораторной диагностики бруцеллеза, в частности разработка методов экспресс-индикации бруцелл представляет важную задачу.

К широко используемым современным методам идентификации клинически значимых видов патогенных микроорганизмов относится времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), основанная на исследовании специфичных белковых профилей экстрактов микробной клетки. В настоящее время основное применение времяпролетной масс-спектрометрии в лабораторной диагностике инфекций заключается не только в получении и сравнительном анализе белковых профилей с базой данных референсных масс-спектров, но и в выявлении высокоспецифичных сигналов – биомаркеров. Несмотря на существование общедоступной базы референсных масс-спектров высоко-патогенных микроорганизмов (RKI, v.3), содержащей в том числе

масс-спектры 525 штаммов 10 видов бруцелл, выделенных в Германии, Австрии, Чехии, Нидерландах и Аргентине, не вызывает сомнения актуальность пополнения ее российскими изолятами. Кроме того, высокое сходство масс-спектров белковых экстрактов культур разных видов бруцелл определяет сложность проведения корректной идентификации возбудителя бруцеллеза с помощью MALDI-TOF MS до уровня вида, в том числе при использовании стандартного программного обеспечения MALDI Biotyper.

Применение MALDI-TOF MS для выявления возбудителей особо опасных инфекций в клиническом материале на настоящий момент включает этап выделения культуры. Вместе с тем, необходимость использования при MALDI-TOF MS исследования культуры возбудителя, время выделения которой для бруцелл составляет несколько суток, также существенно увеличивает продолжительность исследования и осложняет применение метода на практике. Следует отметить, что использование MALDI-TOF MS для ускоренного выявления бруцелл непосредственно в исследуемом материале, в частности, в крови больных без этапа выделения чистой культуры или подрачивания бактериальной массы на стадии пробоподготовки – перспективное направление совершенствования лабораторной диагностики. Разработанный компанией Bruker Sepsityper module для идентификации микроорганизмов непосредственно в гемокультуре требует капитальных финансовых вложений для апгрейда основного оборудования и стандартного программного обеспечения, что является неприемлемым для большинства учреждений Роспотребнадзора и здравоохранения.

Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность цели данного диссертационного исследования, состоящей в разработке методических подходов и алгоритмов биоинформационного анализа для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, несомненна.

Новизна результатов исследования и их значимость для науки и практической деятельности

В ходе диссертационного исследования создана электронная база референтных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза (в том числе российских изолятов) для идентификации и дифференциации *B. melitensis*, *B.*

abortus, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*. Разработан алгоритм идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, включающий анализ совокупности сигналов, специфичных для представителей шести видов бруцелл. Предложена методика обеззараживания и пробоподготовки крови, подозрительной на инфицирование возбудителем бруцеллеза, для анализа методом времяпролетной масс-спектрометрии без этапа выделения культуры или подрачивания в образце. Представлен алгоритм биоинформационного анализа MALDI-TOF MS 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.

Научная значимость результатов заключается в получении новых данных масс-спектрометрического анализа клеточных белков российских штаммов шести видов *Brucella* spp. для идентификации и типирования изолятов возбудителя бруцеллеза. Показана эффективность разработанного альтернативного биоинформационного подхода для интерпретации полученных масс-спектрометрических данных. Представлено научное обоснование применения метода MALDI-TOF MS для дифференциации крови больных острым бруцеллезом и здоровых людей без этапа выделения культуры или подрачивания возбудителя. Экспериментально обосновано использование в качестве образца для выявления возбудителя бруцеллеза методом времяпролетной масс-спектрометрии экстракта лейкоцитарной фракции крови.

Практическая значимость результатов исследования представлена созданием и государственной регистрацией двух электронных баз белковых профилей референсных штаммов и клинических изолятов возбудителя бруцеллеза, а также разработкой и утверждением двух методических рекомендаций учрежденческого уровня, которые используются при выполнении диагностических исследований в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза.

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов диссертации

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы результатами экспериментальных исследований. Достоверность

научных положений и выводов подтверждается репрезентативностью выборки объектов исследования, длительным сроком наблюдений, использованием методов исследования и статистической обработкой полученных результатов, адекватных целям и задачам исследования. В соответствии с целью и задачами работы применяли микробиологические, физико-химические и микроскопические методы, при проведении экспериментов использовали как модельные системы (модельные клинические образцы крови), так и лабораторных животных.

Оценка структуры и содержания, соответствия требованиям, предъявляемым к диссертациям

Диссертационная работа построена традиционно, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих материалы и методы, глав 3 и 4, выводов, заключения, списков сокращений и использованной литературы. Рукопись диссертационной работы изложена на 134 страницах компьютерного текста и иллюстрирована 29 рисунками и 2 таблицами. Список литературы включает 164 источника, из них: 34 – отечественных и 130 – зарубежных.

Содержание диссертации свидетельствует о выполнении намеченных задач, завершенности исследования и достижении поставленной цели. Во введении диссертации представлена актуальность темы исследования и степень ее разработанности, сформированы цель и задачи, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности, апробация результатов и личный вклад соискателя. Выводы обоснованы полученными результатами проведенного диссертационного исследования и соответствуют поставленным задачам.

По теме диссертации опубликованы 20 научных работ, из них 5 в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, из которых 2 статьи в журналах, индексируемых в международной базе цитирования Scopus и 3 – в Web of science RSCI; зарегистрированы 2 электронные базы данных.

Автореферат содержит основные положения и отражает суть выполненной работы.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в качестве научной основы при разработке эффективного методического подхода к прямому выявлению бруцелл в крови с использованием времяпролетной масс-спектрометрии. Полученные данные открыли возможность разработки схемы биоинформационного анализа данных MALDI-TOF MS с помощью среды языка программирования «R», что позволило дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей. Показана возможность выявления специфичных маркеров возбудителя бруцеллеза в крови больных с острой формой заболевания методом MALDI-TOF MS без этапа выделения культуры или подращивания бактериальной массы на стадии пробоподготовки. 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.

По представленной диссертационной работе есть ряд вопросов и замечаний, изложенных ниже:

- 1) Существующая в настоящее время база масс-спектров высоко патогенных микроорганизмов RKI v.3 (институт Р. Коха, Германия), находится в общем доступе и содержит белковые профили 10 видов бруцелл. В чем основное отличие базы референсных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза, разработанной в ходе диссертационной работы?
- 2) В главе «Обзор литературы» раздел 1.3. заканчивается выводом, что ПЦР позволяет проводить не только выявление в клиническом материале, но и определение принадлежности бруцелл к отдельному виду и биовару. Какими преимуществами обладает используемый автором подход?
- 3) В главе «Материалы и методы» говорится, что исследования проводились в соответствии с действующими нормативными документами, при этом ссылки на эти документы отсутствуют.

- 4) Требуется уточнения вопрос о необходимости изменения для микроорганизмов рода *Brucella* протокола пробоподготовки для индикации и идентификации микроорганизмов I-II групп патогенности по МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности».
- 5) Отсутствует четкая формулировка предложенного алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI TOF масс-спектрометрии.
- 6) Насколько экономически целесообразно использование предложенного алгоритма и программного обеспечения для индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза в крови в сравнении с коммерческим модулем Sepsityper?
- 7) Таблицы 1 и 2 содержат различающуюся информацию по количеству исследованных штаммов различных видов бруцелл.

Несмотря на сделанные замечания, диссертация заслуживает общей положительной оценки, что позволяет классифицировать ее как законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне.

Заключение

Диссертация Ульшиной Дианы Васильевны, выполненная на тему «Выявление и межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии», представляемая к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, 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 N 842 (в редакции Постановления РФ от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020) предъявляемым к кандидатским диссертациям, а диссертант заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв на диссертацию обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, протокол № 8 от 29 октября 2020 г.

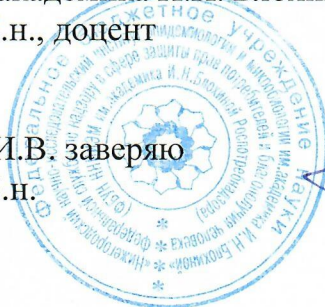
Отзыв составлен:

В.н.с.-заведующий лабораторией микробиома
человека и средств его коррекции
ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной
Роспотребнадзора, д.б.н., доцент



И.В. Соловьева

Подпись Соловьевой И.В. заверяю
Ученый секретарь, к.б.н.



М.С. Снегирева