



ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Ульшиной Дианы Васильевны
«МЕЖВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ» на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –
микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования. Бруцеллез - один из самых значимых и распространенных зоонозов в мире, практически ежегодно проявляющий себя эпизоотическими вспышками и заболеваемостью населения. В настоящее время к роду *Brucella* относят 12 видов - *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. rapionis*, *B. vulpis*. Учитывая эпидемиологическую значимость патогена, видовая идентификация бруцелл имеет ключевое значение при проведении лабораторной диагностики инфекции. Определение видовой принадлежности изолята микроорганизма, основанное на анализе комплекса фенотипических признаков, позволяет установить принадлежность исследуемой культуры к определенному биовару, вместе с тем, традиционная схема идентификации характеризуются трудоемкостью, длительностью, и, в ряде случаев, не исключает ошибки. Дополнительные риски определяются необходимостью манипуляций с живыми культурами возбудителя.

Совершенствование схемы лабораторной диагностики бруцеллеза за счет разработки и внедрения современных высокочувствительных аналитических методов, основанных на характеристике особенностей генома и протеома бруцелл, является актуальной задачей, решение которой позволит существенно сократить время, необходимое для исследования, а также повысить его достоверность и эффективность.

На сегодняшний день времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) зарекомендовала себя как эффективный экспресс-метод индикации и дифференциации микроорганизмов, однако, область его применения в отношении возбудителей особо опасных инфекций ограничена малым количеством референсных, характеристических масс-спектров клеточных белков патогенов, используемых при определении видовой принадлежности или молекулярном типировании исследуемого штамма в качестве эталона сравнения. Важной задачей является также подбор соответствующих аналитических алгоритмов, обеспечивающих поиск и выявление аналитически значимых сигналов (биомаркеров) с возможностью проведения различных видов кластеризации большого массива данных, а также последующей визуализацией результатов. Таким образом, в настоящее время внедрение MALDI-TOF масс-спектрометрии в систему лабораторной диагностики бруцеллеза требует разработки стандартизированных подходов к пробоподготовке, формированию и оценке масс-спектров, интерпретации полученных результатов, что и определяет актуальность настоящего диссертационного исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций. Обоснованность положений, выносимых на защиту, выводов по результатам диссертационного исследования, а также выработанных на основании полученных результатов рекомендаций подтверждена большим объемом корректных экспериментальных данных, адекватно проведенным теоретическим анализом избранной проблематики, и, в целом, соответствием полученных результатов поставленным цели и задачам.

Диссертационная работа выполнена с использованием комплекса современных методов микробиологического и протеомного анализа, современного аналитического высокотехнологического оборудования.

Основные научные положения представленной к защите диссертационной работы о создании электронной базы референсных масс-спектров штаммов *Brucella* spp., оптимизации методики обеззараживания и подготовки проб культур бруцелл для исследования методом MALDI-TOF, выявлении биомаркеров для межвидовой дифференциации *Brucella* spp., возможности индикации *Brucella* spp. в модельных гемокультурах без выделения или накопления возбудителя с помощью времяпролетной масс-спектрометрии, разработке алгоритма биоинформационного анализа, позволяющего проводить межвидовую дифференциацию *Brucella* spp. на основании анализа белковых профилей возбудителя, а также особенностях масс-спектрометрических профилей крови больных бруцеллезом людей подтверждены соответствующими результатами экспериментальной части диссертационного исследования.

Научная новизна полученных в диссертационной работе результатов состоит прежде всего в разработке комплекса методических подходов и алгоритмов анализа для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Автором сформирована 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, экспериментально обосновано применение агара Альбими при подготовке культур возбудителя бруцеллеза для масс-спектрометрического профилирования, разработан алгоритм идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на основе анализа совокупности масс-спектрометрических сигналов, специфичных для представителей *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*. разработана методика, позволяющая проводить обеззараживание и пробоподготовку образцов крови, подозрительной на инфицирование возбудителя бруцеллеза для масс-спектрометрического анализа, впервые продемонстрирована возможность выявления специфичных мар-

кером возбудителя бруцеллеза в крови методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или подращивания возбудителя в образце, а также охарактеризован комплекс аналитически значимых сигналов – биомаркеров, позволяющих проводить дифференциацию белковых профилей образцов крови больных бруцеллезом от масс-спектров проб крови условно здоровых людей. Также предложен алгоритм биоинформационного анализа MALDI-TOF MS данных в среде языка программирования «R», позволяющий дифференцировать образцы крови больных бруцеллезом от условно здоровых людей и обеспечивающий необходимые критерии качества дифференциации анализируемых объектов.

Практическая значимость диссертационной работы Ульшиной Д.В. заключается, прежде всего, в том, что разработанные в ходе ее выполнения методические приемы и алгоритмы внедрены в практику деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза (Акт внедрения №1 от 03.12.2018 г.) и применяются для идентификации и таксономической классификации изолятов возбудителя бруцеллеза до вида.

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» (номер государственной регистрации 2016620345).

Разработаны и утверждены на учрежденческом уровне методические рекомендации «Порядок подготовки и анализа проб крови, подозрительной на присутствие возбудителя бруцеллеза, при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией» (утв. 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» (утв. 26.09.2018 г., протокол № 6).

Структура и объем диссертации. Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 164 источника, в том числе зарубежных – 130.

Во **Введении** излагается актуальность выбранного направления, приведена также основная информация по выдвигаемым на защиту положениям диссертационного исследования, сведения по их новизне и практической значимости, этапах апробации диссертации, публикациях по теме работы и структуре исследования.

Литературный обзор состоит из пяти подразделов, посвященных современной таксономии рода *Brucella*, методам детекции и типирования возбудителя бруцеллеза, основным молекулярно-генетическим методам, используемым для идентификации и дифференциации видов бруцелл, применению масс-спектрометрического

профилирования для определения видовой принадлежности и характеристики патогенных бактерий, и, частности, бруцелл. Обзор дает достаточно полное представление об основных направлениях и тенденциях исследований в избранной соискателем предметной области.

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление о том, что автором диссертационного исследования использованы современные и разнообразные методические подходы. Глава достаточно информативна и, в целом, дает полное представление о комплексе методических подходов, использованных в работе.

В **главе 3** приведены результаты разработки стандартизованного алгоритма идентификации и дифференциации видов бруцелл методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Автором подобран оптимальный режим проведения масс-спектрометрического анализа белковых экстрактов штаммов возбудителя бруцеллеза, обеспечивающий воспроизводимое получение качественных белковых профилей, продемонстрировано, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным, определены оптимальные значения характеристик валидного масс-спектра при анализе культур возбудителя бруцеллеза (абсолютная интенсивность пиков, разрешение, общее число идентифицированных пиков, величина соотношения сигнал/шум), сформирована пополняемая база характеристических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза, включающая 96 референсных масс-спектров. На основании анализа белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper Offline Classification с применением сформированной базы данных показана высокая эффективность применения метода MALDI-TOF MS для достоверной идентификации и типирования культур возбудителя бруцеллеза.

Выявленные автором определенные ограничения базового варианта аналитического инструментария для типирования штаммов бруцелл с дифференциацией их видовой принадлежности послужили основанием для подбора оптимизированного алгоритма анализа масс-спектральных сигналов, при этом была продемонстрирована эффективность применения прикладных пакетов в среде языка статистического программирования «R» для биоинформационной обработки данных масс-спектрометрии белковых экстрактов культур в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза, имеющих клиническое значение: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

В **Главе 4** приведены результаты разработки технологии прямой детекции возбудителя бруцеллеза в образцах биологического происхождения. Автором охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать пробы, искусственно контаминированные возбудителем бруцеллеза, показано, что исполь-

зование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции представляется более предпочтительным по сравнению с супернатантом при детекции патогена в крови методом MALDI-TOF MS.

На основании сравнительного анализа масс-спектров проб крови больных бруцеллезом людей установлена совокупность аналитически значимых масс-спектральных сигналов, в том числе родоспецифичных для бруцелл. Данный комплекс сигналов позволяет точно дифференцировать масс-спектры образцов крови больных бруцеллезом людей от спектров здоровых без этапа выделения чистой культуры или накопления возбудителя в образце (чувствительность метода прямой детекции бруцелл в крови больных методом MALDI-TOF MS составила 90,48 %, специфичность – 96,3 %, точность – 94,67 %).

Заключение. В данном разделе приведено обобщение полученных в работе результатов и приведена их краткая характеристика. Необходимо отметить, что в данном разделе диссертационного исследования также уместным было бы мнение автора о перспективах и областях дальнейшего приложения полученных результатов.

Выводы. Автором диссертационного исследования сформулировано 7 достаточно емких по содержанию выводов, соответствующих основным блокам полученных в работе результатов.

Соответствие диссертационной работы и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней». Теоретический и методический уровень, на котором выполнена работа, большой объем экспериментальных данных, их комплексный анализ и доказательный иллюстративный материал делают научные положения, содержащиеся в диссертации, обоснованными и аргументированными. Содержание автореферата полностью адекватно основному содержанию диссертационной работы, приведенный список публикаций по теме диссертации (20 печатных работ, из которых 5 статей в рекомендованных ВАК изданиях) свидетельствует о достаточном освещении материалов исследования в научной периодике. Личный вклад соискателя Ульшиной Д.В. в выполнение исследования является основным.

Замечания, возникшие в ходе рецензирования, носят, в основном, редакционный характер и не отражаются на общей положительной оценке диссертационного исследования. Хотелось бы, также, услышать ответы соискателя на следующие вопросы:

1) Являются ли перечисленные автором на с. 61 критерии качества полученных масс-спектральных данных (разрешение пиков масс-спектра, соотношение сигнал/шум, общее число идентифицируемых пиков в пик-листе, интенсивность пиков, анализируемый диапазон m/Z) универсальными, либо данный перечень специфичен лишь в отношении объекта исследований и экспериментально обоснован именно в ходе данного диссертационного исследования?

2) В чем, по мнению автора, состоит преимущество использования метрики Чебышева при вычислении степени схожести (расстояния) между сравниваемыми масс-спектрами, и в чем выражается соотносимость результатов кластеризации с использованием этого алгоритма данных масс-спектрометрического профилирования и филогенетического анализа штаммов бруцелл, о которой упомянуто на с. 70?

Заключение

Диссертация Д.В. Ульшиной является завершенной научной квалификационной работой. Соответствие рецензируемого исследования специальности 03.02.03 «микробиология» убедительно обосновано целью, задачами, методическими подходами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами. В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к ее решению, научно-практическому значению результатов диссертационная работа «Межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии» отвечает критериям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., с изменениями, утвержденными постановлениями Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а автор работы Ульшина Диана Васильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент

Викторов Дмитрий Викторович
доктор биологических наук, доцент
зам. директора по научно-экспериментальной работе
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7
тел. +7 (8442) 373365, +79053395908
e-mail: dvictorov09@gmail.com



подпись Д.В. Викторова заверяю:

начальник отдела делопроизводства
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора

Е.А. Чернова