

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
ПРИПУТНЕВИЧ ТАТЬЯНЫ ВАЛЕРЬЕВНЫ**

на диссертацию Ульшиной Дианы Васильевны на тему:
«Межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллеза
с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии», представляемую
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 - микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования.

Бруцеллёз на современном этапе рассматривается Всемирной организацией здравоохранения как один из наиболее опасных и распространённых зоонозов в мире. Ежегодно более чем в 170 странах регистрируется свыше 500 тысяч случаев заболевания людей.

В Российской Федерации на протяжении последних 10 лет эпизоото-эпидемическая ситуация по бруцеллёзу характеризовалась как неблагоприятная и стойкого улучшения не наблюдалось. В период 2010-2019 годы в Российской Федерации зарегистрировано 3820 случаев впервые выявленного бруцеллёза среди людей. Среднемноголетний показатель заболеваемости на 100 тысяч населения составил 0,26, среди детей до 17 лет – 0,11 на 100 тысяч населения. Наибольшее количество случаев бруцеллёза выявлено на территориях СКФО, ЮФО, ПФО и СФО. Всего в 2019 году зарегистрировано 397 случаев заболевания людей бруцеллёзом (0,27 на 100 тыс. нас.), в том числе 23 (0,08 на 100 тыс. нас.) – среди несовершеннолетних. Количество заболевших бруцеллёзом и значение интенсивного показателя заболеваемости на 100 тысяч населения в 2019 году сопоставимо со среднемноголетними значениями за последние 10 лет. Эпидемические проявления бруцеллёза на территории России тесно связаны с активностью эпизоотического процесса среди основных эпидемически значимых видов сельскохозяйственных животных – мелкого рогатого и, в большей степени, крупного рогатого скота, тренд заболеваемости которого восходящий.

Бруцеллёз у человека демонстрирует многообразие симптомов при различных клинических проявлениях. Многоликость клинического течения преимущественно острого бруцеллёза с учётом неблагоприятия современной эпидемиологической ситуации и распространённости его в мире актуализирует проблему совершенствования методов и методических подходов для диагностики и верификации бруцеллёзной инфекции.

В настоящее время лабораторная диагностика бруцеллёза включает микробиологические, серологические и молекулярно-генетические методы. Микробиологические тесты продолжают оставаться необходимым элементом

исследования, несмотря на их длительность и трудоёмкость. Широко используемые серологические методы являются стандартом при постановке диагноза у инфицированных людей, но проявляют недостаточную эффективность в случаях хронической бруцеллёзной инфекции.

Известно, что классификация патогена на виды и биовары до сих пор проводится на основании комплекса фенотипических признаков, что обуславливает возникновение трудностей при интерпретации результатов из-за отсутствия необходимого уровня стандартизации используемых для этих целей диагностических инструментов. Вместе с тем, точность и специфичность регламентированных методов межвидовой и внутривидовой дифференциации представителей рода *Brucella* недостаточно высока и включает необходимость проведения манипуляций с живыми культурами возбудителя бруцеллёза.

Совершенствование микробиологической диагностики бруцеллёза заключается в разработке алгоритмов идентификации патогена с использованием современных высокочувствительных методов исследования, позволяющих осуществлять молекулярно-генетическую и протеомную характеристику выделяемых культур на штаммовом уровне.

Метод MALDI-TOF MS анализа, характеризуется сравнительно высокой чувствительностью, специфичностью и относится сегодня к методам «быстрой микробиологии». В настоящее время MALDI-TOF MS успешно внедряется в рутинную практику микробиологических лабораторий и может быть использован для детекции и дифференциации различных бактериальных патогенов. Совершенствование и внедрение протоколов пробоподготовки, протоколов самого исследования и пополнение баз данных различными спектрами микроорганизмов способствовало увеличению разрешающей способности этого метода при идентификации и дифференциации целого ряда грамположительных/грамотрицательных бактерий и грибов.

Получение специфичных масс-спектров культур возбудителя бруцеллёза дает основание для применения MALDI-TOF MS в целях быстрой идентификации и типирования патогена. Выбор эффективных аналитических алгоритмов, обеспечивающих выявление аналитически значимых сигналов (биомаркёров) на масс-спектрах с возможностью анализа и интерпретации большого массива данных с последующей визуализацией результатов, представляет одну из ключевых задач.

Таким образом, внедрение MALDI-TOF MS в систему индикации, идентификации и типирования патогенных микроорганизмов, в частности возбудителя бруцеллёза, в настоящее время является актуальным, но требует разработки стандартизированных подходов к пробоподготовке,

формированию и оценке масс-спектров, интерпретации полученных результатов, а также подготовки нормативно-методических документов, позволяющих использовать этот метод при диагностики особо-опасных инфекций, что и определяет актуальность настоящего диссертационного исследования.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов.

Все результаты получены автором лично или при его непосредственном участии, включая формулирование актуальности, цели и концепции исследования, в проведении сбора и анализа литературных данных в рамках проблематики, планировании и постановке экспериментов, апробации использованных в работе технологий, обработке, анализе и интерпретации результатов исследования, их оформлению и публикации.

Структура и объём диссертации.

Диссертация имеет классическую структуру и представлена главами: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, заключение, выводы и список литературы, включающий 164 источника.

Введение содержит 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.

Обзор литературы включает пять подразделов, которые содержат информацию о современной таксономии рода *Brucella*, методам детекции и типирования возбудителя бруцеллёза, основным молекулярно-генетическим методам, используемым для идентификации и дифференциации видов бруцелл, применению масс-спектрометрического профилирования для определения видовой принадлежности и характеристики патогенных бактерий, и, в частности, бруцелл. Обзор литературы позволяет сформировать представление об основных направлениях и тенденциях исследований в избранной соискателем предметной области, но при этом обращает на себя внимание не полный анализ отечественных работ.

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

Глава 3 посвящена результатам разработки стандартизованного алгоритма идентификации и дифференциации культур возбудителя бруцеллёза разных видов методом времяпролетной масс-спектрометрии. В ходе выполнения диссертационной работы подобран оптимальный режим проведения анализа белковых экстрактов штаммов возбудителя бруцеллёза методом MALDI-TOF MS, что позволило получить воспроизводимую регистрацию качественных белковых профилей, продемонстрировано, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным, определены значения характеристик валидного масс-спектра при анализе культур возбудителя бруцеллёза, сформирована пополняемая электронная база характеристических масс-спектров 96 штаммов *Brucella* spp.

На основании анализа белковых профилей экстрактов культур бруцелл в среде Biotyper Offline Classification с использованием сформированной базы данных показана высокая эффективность применения метода MALDI-TOF MS для достоверной идентификации и типирования бруцелл шести видов. Продемонстрирована эффективность прикладных пакетов в среде языка статистического программирования «R» для биоинформационной обработки данных масс-спектрометрии белковых экстрактов культур патогена в целях межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллёза, имеющих клиническое значение: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*.

Глава 4 содержит результаты разработки алгоритма прямого выявления возбудителя бруцеллёза в образцах биологического происхождения. Автором охарактеризован комплекс сигналов, позволяющий достоверно дифференцировать пробы крови, искусственно контаминированные возбудителем бруцеллёза, показано, что использование белковых экстрактов лейкоцитарной фракции представляется более предпочтительным по сравнению с супернатантом при детекции патогена в крови методом MALDI-TOF MS.

В ходе сравнительного анализа белковых профилей проб крови больных бруцеллёзом людей автором выявлена совокупность аналитически значимых сигналов, в том числе родоспецифичных для бруцелл. Данный комплекс сигналов позволил точно дифференцировать образцы крови больных бруцеллёзом людей от 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%). При этом, несмотря на полученную высокую чувствительность метода при прямой детекции из образцов цельной крови, на мой взгляд, было бы правильным провести

дополнительные сравнительные исследования на питательных средах для гемокультивирования, используемых стандартно в рутинной микробиологической практике.

Заключение диссертации подводит итог проведённых исследований и результатов и завершается констатацией факта разработки методического подхода для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллёза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием современных биоинформационных технологий.

Выводы диссертации тщательно выверены, являются следствием анализа результатов проделанной работы и соответствуют поставленным задачам исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Обоснованность положений, выносимых на защиту, выводов по результатам диссертационного исследования, а также выработанных на основании полученных результатов рекомендаций подтверждена большим объёмом корректных экспериментальных данных, адекватно проведённым 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.

Представленные в диссертационной работе основные научные положения о создании электронной базы референсных масс-спектров штаммов *Brucella* spp., оптимизации методики обеззараживания и подготовки проб культур бруцелл для исследования методом MALDI-TOF MS, выявлении биомаркёров 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 бруцеллёзом людей подтверждены соответствующими результатами экспериментальной части диссертационного исследования.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.

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». Достоверность результатов работы обоснована достаточным объемом проведенных исследований, выполненных на высоком методическом уровне. Научные положения диссертации представлены на научных конференциях, материалы которых опубликованы в различных сборниках. Работа характеризуется высоким методическим уровнем обработки и анализа данных, что подтверждает обоснованность научных положений и выводов.

Научная новизна результатов состоит, прежде всего, в разработке алгоритмов анализа и комплекса методических подходов, используемых для детекции и межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллѐза при исследовании методом MALDI-TOF MS.

В диссертационном исследовании представлена разработанная электронная база референтных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллѐза для идентификации и дифференциации изолятов *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*, впервые определен комплекс качественных и количественных характеристик масс-спектров в зависимости от используемой питательной среды, экспериментально обосновано применение агара Альбими при подготовке культур возбудителя бруцеллѐза для масс-спектрометрического профилирования, разработан алгоритм идентификации культур возбудителя бруцеллѐза методом времяпролетной масс-спектрометрии на основе анализа группы уникальных сигналов, специфичных для представителей шести видов возбудителя бруцеллѐза. Разработан протокол пробоподготовки, позволяющий проводить обеззараживание проб крови, подозрительной на инфицирование возбудителем бруцеллѐза для масс-спектрометрического исследования, впервые подтверждена возможность выявления специфичных маркѐров возбудителя бруцеллѐза в крови методом MALDI-TOF MS без этапа выделения чистой культуры или подращивания возбудителя, а также охарактеризован комплекс аналитически значимых сигналов - биомаркѐров, дающих возможность проводить дифференциацию белковых профилей образцов крови больных бруцеллѐзом от масс-спектров проб крови условно здоровых людей. Разработан алгоритм биоинформационного анализа масс-спектрометрических данных в среде языка программирования «R», дифференцирующий образцы крови больных бруцеллѐзом от условно здоровых людей и обеспечивающий необходимые критерии качества дифференциации анализируемых объектов.

Практическая значимость результатов.

Практическая значимость диссертационной работы Ульшиной Д.В. заключается во внедрении разработанных в ходе её выполнения: методических приёмов и алгоритмов в практику деятельности референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллёза (Акт внедрения № 1 от 03.12.2018) для идентификации и таксономической классификации изолятов возбудителя бруцеллёза до вида; утверждённых на учрежденческом уровне методических рекомендаций «Порядок подготовки и анализа проб крови, подозрительной на присутствие возбудителя бруцеллёза, при работе методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией» (утв. 30.09.2016, протокол № 9) и «Биоинформационный анализ масс-спектрометрических данных с использованием программных пакетов языка программирования «R» при исследовании проб крови больных или подозрительных по заболеванию бруцеллёзом людей» (утв. 26.09.2018, протокол № 6).

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе в целом.

Диссертация Ульшиной Д.В. на тему «Межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллёза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии» по специальности 03.02.03 – микробиология на соискание ученой степени кандидата биологических наук имеет очевидную практическую ценность, а её автор проявила себя как состоявшийся квалифицированный исследователь. Диссертация написана хорошим научным языком и читается легко. Текст иллюстрирован информативными рисунками.

Теоретический и методический уровень, на котором выполнена работа, большой объём экспериментальных данных, их комплексный анализ и доказательный иллюстративный материал делают научные положения, содержащиеся в диссертации, обоснованными и аргументированными.

Автореферат даёт полное представление о содержании 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.

В ходе подробного изучения работы возникает два вопроса:

1. Сопряжены ли в настоящий момент зарубежные и отечественные базы данных масс-спектров различных видов бруцелл с созданной по результатам проведенного Вами исследования базой данных полученных масс-спектров?
2. Почему полученные результаты не были опубликованы в международных изданиях медицинских журналов?

Заключение.

Диссертация Д.В. Ульшиной является завершённой 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 её решению, научно-практическому значению результатов диссертационная работа «Межвидовая дифференциация штаммов возбудителя бруцеллёза с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии» отвечает критериям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, с изменениями, утверждёнными постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, 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,
доктор медицинских наук
директор института микробиологии,
антимикробной терапии и эпидемиологии
ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»
Минздрава России

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4,
Телефон: +7 495 4382510,

Электронная почта: info@oparina4.ru

Припутневич Татьяна Валерьевна

Подпись Припутневич Т.В. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова»

Минздрава России

кандидат медицинских наук, доцент



Павлов Станислав Владиславович

03.12.2020 года