

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук Ермоловой Екатерины Ивановны на диссертационную работу Устиновой Веры Витальевны на тему: «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Актуальность туберкулеза (ТБ), как одной из ведущих причин инфекционной смертности, вновь подчеркнута в докладе ВОЗ – «WHO Global tuberculosis report 2024» именно с 2023г после завершения пандемии COVID. Распространение ТБ с широкой и множественной лекарственной устойчивостью остается критическим фактором здравоохранения многих стран. По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году» заболеваемость ТБ составила 29,24 случаев на 100 тыс. населения. Одновременно Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC) отмечает рост случаев микобактериозов (МБ), вызываемых многообразием видов нетуберкулезных микобактерий, резистентных к большинству противотуберкулёзных препаратов и требующих иных схем лечения. Официальных статистических данных по МБ в России не представлено. Клинические рекомендации Министерства Здравоохранения Российской Федерации за 2022 г. «Микобактериозы органов дыхания» подчеркивают сходство клинических симптомов МБ и ТБ, важность их дифференциальной диагностики, в том числе и от других болезней легких. Однако перечень зарегистрированных и практически доступных быстрых и эффективных молекулярно-диагностических тестов в нашей стране ограничен. В связи с этим, разработка отечественных тест-систем для совершенствования молекулярно-генетических методов выявления, и дифференциальной диагностики

нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) от микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК), а также видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий особенно актуальна.

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

Выявлены новые, не использованные ранее для обнаружения микобактерий ДНК-мишени, локализованные в генах *metH* (*M. smegmatis*) и *tuf* (*M. tuberculosis* H37Rv), позволяющие дифференцировать нетуберкулезные микобактерии от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий. Выявлены новые, не использованные ранее локусы в геномах *M. avium* и *M. abscessus*, позволяющие идентифицировать 12 видов НТМБ, относящихся как группам медленно, так и быстрорастущих.

Проанализировано 4746 образцов диагностического материала от 1887 пациентов для оценки клинической чувствительности и специфичности разрабатываемой тест-системы для выявления и дифференциации МБТК и НТМБ. Среди образцов культур проверено 18 штаммов НТМБ, 16 штаммов МБТК, 13 штаммов микроорганизмов, не относящихся к микобактериям, из коллекции отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»; 500 штаммов *M. tuberculosis*; 46 штаммов МО, не принадлежащих к роду *Mycobacterium*; 1123 штамма НТМБ из диагностического материала от больных.

Разработана тест-система, основанная на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), для одновременного выявления и дифференциации нетуберкулезных микобактерий от микобактерий туберкулезного комплекса в одной пробирке, позволяющая идентифицировать НТМБ и МБТК в клиническом материале с чувствительностью 74,2% (НТМБ) и 93,5% (МБТК), и со 100% чувствительностью в образцах культур. Разработана тест-система для идентификации НТМБ до вида в образцах клинического материала от больных и культурах, позволяющая идентифицировать 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий: *M. abscessus*, *M.*

avium, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*.
Чувствительность тест-системы – 99,71% (клинический материал) и 99,67% (образцы культур) при специфичности 100%.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Предложены новые генетические локусы для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий, которые могут рассматриваться в качестве дополнительной основы в их систематике и филогенетике. Обоснована возможность применения выбранных мишеней для дальнейшего расширения списка идентифицируемых видов нетуберкулезных микобактерий.

Результаты диссертационной работы внедрены в алгоритм проведения исследований образцов от пациентов лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии ФГБНУ «Центрального НИИ Туберкулёза»; используются в цикле лекций курса повышения квалификации врачей-бактериологов, врачей клинической лабораторной диагностики и врачей фтизиатров учебного центра ФГБНУ «ЦНИИТ» (Акт внедрения ФГБНУ «ЦНИИТ» от 14.01.2023).

Материалы настоящей работы использованы в разработке набора реагентов для выявления генетических маркеров ДНК МБТК и НТМБ, а также дифференциальной диагностики видов нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР-РВ и подготовке регистрационного досье в Росздравнадзор, на основе которого получено регистрационное удостоверение № РЗН 2024/21973 от 12 февраля 2024 года (Акт внедрения ООО «НПФ Синтол» от 20.02.2024).

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация, выполненная Устиновой Верой Витальевной, соответствует пунктам 1, 2, 11 паспорта научной специальности 1.5.11. – Микробиология: 1. Систематика и филогения микроорганизмов; 2. Эволюция микроорганизмов; 11. Геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Материалы диссертации полно представлены в печати. По материалам диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации к защите. Также 5 представлены в сборниках материалов конференций.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и включает следующие разделы введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, приложения. Во введении сформулированы актуальность и степень разработанности темы, цель и задачи исследования, научная новизна, расписаны методология, материалы и методы исследования, отмечен личный вклад автора, степень достоверности и апробация результатов, а также основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы приведены актуальная систематика, микробиологическая и эпидемиологическая характеристики МБТК и НТМБ, подробно изложены доступные методы их лабораторной диагностики.

Результаты собственных исследований и их обсуждение поделены на две главы, посвященных разработанным тест-системам – ПЦР-РВ(д) и ПЦР-РВ(и). Каждая глава содержит подробное описание дизайна эксперимента (обосновывается выбор мишеней, подбор праймеров и Taq-Man зондов, параметры статистической обработки), результаты оценки аналитической чувствительности и специфичности тест-систем на разных объектах (клинический материал, образцы культур), предел обнаружения ДНК (LoD95%), оценки внутрипостановочной сходимости и межпостановочной воспроизводимости результатов.

В заключении обобщены все полученные данные. Выводы объективно отражают суть представленных исследований и соответствуют поставленным экспериментальным задачам. Высокая значимость полученных результатов работы отражена в практических рекомендациях.

Список литературы содержит 325 источников, из которых 60 – отечественные и 265 – зарубежные. Работа включает 200 страниц, 8 рисунков и 21 таблицу.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Диссертационная работа Устиновой В.В. выполнена на высоком уровне. Замечания по тексту диссертации и вопросы, не являются принципиальными.

1. *Замечания по тексту.* • В пункте «Степень достоверности и апробация результатов» (стр. 26) не указаны дата и номер протокола апробации диссертации на заседании секции ученого совета; сведения указаны в автореферате. • Присутствуют стилистические недостатки, опечатки и орфографические ошибки.

2. *Замечания к рисункам.* На рисунках 2 и 3 на выравниваниях не обозначены области геномов, положения посадки праймеров и зондов, и нуклеотидных замен в генах *tuf* и *metH*. Рисунок 6 не содержит подписи маркера молекулярного веса, длины полученных ПЦР-продуктов. Рисунок 7 не достаточного разрешения, что не позволяет изучить его. В Приложении 3 отсутствует обозначение областей посадки разработанных праймеров и зондов для видовой идентификации НТМБ.

3. *Вопросы.* • В рубрике «систематика» МБТК и НТМБ процитированы литературные источники не позднее 2014г. Какие информационные ресурсы и базы данных были использованы для проверки актуальной классификации представителей рода *Mycobacterium*? • В подразделе «Выбор локусов для разработки тест-систем» приведена подробная информация о анализируемых

геномах НТМБ (приложения 1 и 2). Какие геномные данные (и штаммы) МБТК были изучены на этапе планирования тест-системы для дифференциальной диагностики МБТК и НТМБ? • Ввиду гетерогенности эпидемиологических данных о НТМБ, распространенных на территории России, насколько универсален список штаммов, выбранных для их видовой идентификации? Возможна ли при необходимости его корректировка с учетом региональных особенностей? • При использовании разработанных тест-систем в клинико-лабораторной диагностике, есть ли ограничения по возрастным категориям пациентов? • Планирует ли автор в перспективе расширять область применения разработанных тест-систем не только в медицинской, но ветеринарной практике?

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают высокой оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа *Устиновой Веры Витальевны* на тему: «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология, выполненной под руководством *Смирновой Татьяны Геннадиевны*, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи – разработка тест-систем, основанных на технологии ПЦР в режиме реального, для быстрого одновременного дифференциального выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса в одной пробирке и для идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида. Таким образом, диссертационная работа *Устиновой Веры Витальевны* «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса» по своей актуальности, научной новизне и практической значимости результатов,

объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации 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, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 № 1382), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор *Устинова Вера Витальевна* заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Старший научный сотрудник лаборатории анализа геномов
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18
Тел. +7(499)193-30-31
e-mail: info@gamaleya.org
кандидат биологических наук

Ермолова Екатерина Ивановна

Подпись Ермоловой Екатерины Ивановны заверяю

Ученый секретарь ученого совета
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18
Тел. +7(499)193-30-31
e-mail: info@gamaleya.org
кандидат биологических наук



Сысолятина Елена Владимировна

28.01.2025