

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Макаровой Марины Витальевны 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

Актуальность темы исследования

Несмотря на поставленную ВОЗ задачу ликвидировать туберкулез к 2035 году, согласно глобальным докладам последних лет, число случаев заболевания продолжает расти. В последние 20 лет отмечают и рост заболеваемости микобактериозом, который вызывают нетуберкулезные микобактерии (НТМБ). Согласно результатам ряда исследований для 90% регионов Канады, США, Великобритании, Чехии, Швеции, Дании, Японии, Греции показана корреляция снижения заболеваемости туберкулезом с ростом заболеваемости микобактериозом. В экономически неблагополучных странах, особенно тех, для которых туберкулез является эндемичным заболеванием, также отмечают рост случаев микобактериоза легких, который может быть недооценен ввиду недостаточной оснащенности лабораторий и нехватки специалистов, что приводит к постановке ложного диагноза туберкулёз больным с микобактериозом легких.

Проблема микобактериоза является актуальной и активно изучается и на территории Российской Федерации. Чаще всего больные микобактериозом с легочной локализацией попадают в противотуберкулезные учреждения с подозрением на туберкулез ввиду сходства клинико-рентгенологической картины заболеваний. Имеют место случаи постановки ложного диагноза «туберкулёз» больным микобактериозом, что недопустимо, т.к. НТМБ резистентны к большинству противотуберкулёзных препаратов (ПТП), и заболевания, вызываемые ими, требуют других схем лечения. Поэтому важно

иметь инструмент для быстрой дифференциации НТМБ от микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) и идентификации их до вида, так как схемы лечения заболеваний, вызванных разными видами НТМБ, также различаются.

Наиболее быстрыми методами, обладающими максимальной специфичностью и чувствительностью, позволяющими выявлять и дифференцировать НТМБ от МБТК и идентифицировать до вида, на сегодняшний день являются молекулярно-генетические. На данный момент для использования в медицинских организациях на территории Российской Федерации зарегистрирована одна тест-система, основанная на технологии ПЦР в режиме реального времени, для выявления и дифференциации НТМБ от МБТК (ООО «ТестГен, 2023). Тест-системы для видовой идентификации НТМБ раньше были представлены на российском рынке наборами реагентов Genotype Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Germany), основанными на технологии обратной гибридизации предварительно амплифицированных специфических фрагментов ДНК с зондами, иммобилизованными на нитроцеллюлозном носителе, однако, эти наборы не поставляют в РФ с 2022 года.

В этой связи разработка молекулярно-генетических тест-систем, которые позволили бы повысить эффективность микробиологической диагностики заболеваний, вызываемых микобактериями, что и является целью диссертационного исследования Устиновой Веры Витальевны на тему «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса», актуальна и экономически целесообразна.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате проведенных исследований автором Устиновой Верой Витальевной были получены результаты с высокой степенью новизны: предложены новые, не использовавшиеся ранее, ДНК-мишени, локализующиеся в генах *meth* и *tuf*, для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК и

родственных кислотоустойчивых бактерий. Выявлены новые, не использовавшиеся ранее, ДНК-мишени для идентификации 12 видов НТМБ. Впервые разработана тест-система, основанная на технологии ПЦР в режиме реального времени, для одновременного выявления и дифференциации НТМБ и МБТК в одной пробе клинического материала или образца культуры. Впервые разработана тест-система, основанная на технологии ПЦР в режиме реального времени, для идентификации 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий в образцах культур и диагностического материала от больных: *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentijlavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*.

На основании обобщения полученных в диссертационном исследовании данных Устинова Вера Витальевна сформулировала оригинальные выводы, ранее не встречавшиеся в доступной печати, а также предложила рекомендации по использованию его результатов.

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

Должная высокая степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Устиновой Веры Витальевны основана на использовании целесообразных, в соответствии с поставленными задачами, технологий, современных и адекватных биоинформатических, молекулярно-биологических и микробиологических методов, достаточной биологической повторностью, учётом и анализом результатов с использованием методов статистической обработки данных, на достаточном количестве исследованных биологических образцов (культур микобактерий и образцов диагностического материала, выделенного от пациентов ФГБНУ «ЦНИИТ»).

Выводы представленного исследования соответствуют поставленным задачам и подтверждены результатами исследования. Диссертация Устиновой Веры Витальевны выполнена в рамках НИР «Геномное секвенирование клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий, распространенных

Материалы настоящей работы использованы в разработке набора реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий, 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).

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Диссертация апробирована на заседании секции ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (протокол №1 от 20 декабря 2023 г.).

Полученные в работе данные были представлены на научных конференциях и форумах всероссийского и международного уровней, включая конференции молодых ученых с международным участием, посвященные Международному Дню борьбы с туберкулезом (Москва, 2016, 2017), IV Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2016), Заседание Межрегиональной общественной организации «Московское общество фтизиатров» (Москва, 2017), Международный конгресс Европейского респираторного общества ERS international congress 2017 (European Respiratory Society, Милан, 2017); 2-й Санкт - Петербургский Симпозиум по туберкулезу и микобактериям (Санкт-Петербург, 2018). Результаты опубликованы в 10 печатных изданиях, из них 5 - рецензируемые научные издания 5 - материалы конференций.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Текст диссертационного исследования Устиновой Веры Витальевны изложен на 200 страницах машинописного текста и имеет стандартную структуру: введение, обзор литературы, четыре главы результатов собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы

дальнейшей разработки, список сокращений, список литературы и семь приложений. Диссертация иллюстрирована 21 таблицами и 8 рисунками. Список литературы содержит 325 источников, из которых 60 - отечественные и 265 - зарубежные.

Во введении автор отразила все необходимые позиции, предъявляемые к законченным диссертационным исследованиям: актуальность, степень разработанности темы, цель, задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, материалы и объект исследования. Раздел написан четко и свидетельствует о понимании автором проблемы и задач, поставленных ее для решения.

Отдельно необходимо отметить описание методов, использованных в работе, традиционных микробиологических и молекулярно-генетических, а также специфических для данной работы, включающих программное обеспечение, базы данных и расчет геном-эквивалентов в образцах ДНК. Перечислены методы статистической обработки данных. Учитывая огромный объем исследования и разнообразие методологических подходов, важно было отметить личное участие Устиновой Веры Витальевны в работе, которое свидетельствует о высокой, основной степени участия в проведении работ и написании диссертации.

В завершении раздела «Введение» логично сформулированы два положения, выносимые на защиту, а также степень достоверности и апробация результатов.

Глава 1 представляет обзор литературных данных, посвященных микобактериям туберкулезного комплекса и нетуберкулезным микобактериям. Обзор включает современные представления о классификации, биологических свойствах и инфекциях, вызываемых микобактериями: туберкулезе и микобактериозе, факторах предрасположенности, эпидемиологии заболеваний, методам их лабораторной диагностики. Приведенные в обзоре сведения логично приводят к выводу о крайней необходимости ускоренного выявления и идентификации возбудителей микобактериальных инфекций для проведения

эффективной адекватной химиотерапии и профилактических мероприятий.

Обзор написан четко, раскрывает актуальность темы и затрагивает нерешенные проблемы в этой области, приведено много новых данных, которые критически оцениваются, тест-системы сравниваются по специфичности и чувствительности, трудозатратам и влиянию человеческого фактора.

Собственные результаты изложены в двух главах.

Глава 2 посвящена разработке тест-системы ПЦР-РВ для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в одном образце диагностического материала/культуры и включает 5 подразделов. Проведена огромная работа, результаты которой сведены в 9 таблиц и 4 рисунка. Шаг за шагом Устинова Вера Витальевна проводит работу по разработке праймеров и Таq-Маn зондов для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК, затем оценивает чувствительность и специфичность тест-системы ПЦР-РВ для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ на ДНК, выделенной из культур микроорганизмов и образцов клинического материала. Для полной характеристики тест-системы автор оценивает 95% предел обнаружения (LoD95%) ДНК микобактерий в пробе клинического материала. На основании полученных в этом разделе результатов были сформулированы первые четыре вывода.

Глава 3 собственных результатов посвящена разработке тест-системы ПЦР-РВ для видовой идентификации НТМБ в образцах диагностического материала/культур от больных, включает 6 подглав, результаты отображены в 9 таблицах и 3 рисунках. На начальном этапе был проведен отбор видов НТМБ для разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ в образцах диагностического материала/культур от больных, затем проводилась разработка праймеров и Таq-Маn зондов, а также дизайна тест-системы для видовой идентификации НТМБ. Для характеристики тест-системы Устинова Вера Витальевна проводила исследования по оценке аналитической чувствительности и специфичности тест-системы для видовой идентификации НТМБ в образцах культур, а также по оценке эффективности ПЦР для видов НТМБ, идентифицируемых разработанной тест-системой, кроме того, оценивала чувствительность и специфичность тест-системы для видовой

идентификации НТМБ в образцах клинического материала и образцах культур, полученных из этого клинического материала. Важно, что была проведена оценка внутривыставочной сходимости и межвыставочной воспроизводимости результатов идентификации НТМБ для тест-системы в пробе клинического материала, что безусловно делает разработку законченной и полностью охарактеризованной. Полученные в этой части результаты легли в основу трех выводов (5, 6, 7), адекватность которых не вызывает сомнения.

Заключение посвящено проблеме повышения эффективности микробиологической диагностики инфекций, вызываемых микобактериями. Фактически, это обсуждение полученных результатов, описание достоинства созданных тест-систем, сравнение с ранее используемыми в мире, демонстрация значительного преимущества разработанных инновационных тест-систем для отечественной фтизиатрии. Важно, что была дана не только исчерпывающая характеристика наборов по специфичности и чувствительности, но и по другим существенным показателям. Также были приведены результаты испытаний на адекватно подобранном диагностическом материале, с учетом всех контролей специфичности и отрицательного контроля.

Семь выводов, сформулированные Устиновой Верой Витальевной концентрируют полученные результаты, выделяют главное и полностью соответствуют проведенным исследованиям.

Практические рекомендации, предложенные автором, безусловно могут быть поддержаны, поскольку непосредственно вытекают из материалов диссертации и имеют как теоретическую, так и практическую направленность. Рекомендуется использовать разработанные тест-системы для одновременной дифференциации НТМБ и МБТК и тест-систему ПЦР-РВ для видовой идентификации *M. avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi* в микробиологических лабораториях при лечебных учреждениях соответствующего профиля. Для расширения панели выявляемых видов нетуберкулезных микобактерий рекомендуется использовать генетические локусы, уже отобранные в

результате разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ.

Учитывая огромную практическую значимость разработанных отечественных технологий, считаю необходимым отметить перспективы разработки темы, заключающиеся в дальнейшем проведении клинических испытаний тест-системы для одновременного выявления и дифференциации НТМБ и МБТК с целью регистрации медицинского изделия для диагностики *in vitro*; расширение панели видов НТМБ, выявляемых разработанной тест-системой для видовой идентификации, а также в проведении клинических испытаний вновь разработанной тест-системы ПЦР-РВ для расширенной видовой идентификации НТМБ и регистрации медицинского изделия для диагностики *in vitro*.

К тексту диссертации прилагаются семь приложений, значение которых трудно переоценить. Только перечисление названий свидетельствует о прецизионном подходе автора к исполнению работ. Кроме того, 4, 5, 6 и 7 приложения представляют собой данные по оценке сходимости и воспроизводимости результатов, полученных с использованием разработанных тест-систем на различных термоциклерах, отечественных и зарубежных.

Соответствие специальности

Совокупный анализ диссертационного исследования Устиновой Веры Витальевны на тему «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса» позволяет сделать общий вывод о соответствии работы специальности 1.5.11 - микробиология.

Диссертация выполнена на актуальную тему, все поставленные задачи решены, выводы отражают основные результаты, имеющие огромную теоретическую и практическую значимость для микробиологии и фтизиатрии, в частности, для повышения эффективности персонализированного лечения социально-значимых микобактериальных инфекций, за счет создания отечественных тест-систем ускоренного выявления, дифференциации НТМБ от МБТК и видовой идентификации НТМБ.

Автореферат диссертационного исследования Устиновой В.В. отражает

содержание, результаты и выводы диссертационной работы в необходимом объёме, соответствует тексту диссертации, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами.

Диссертация написана на хорошем русском языке, грамотно. Принципиальных замечаний нет, имеются незначительные технические опечатки, которые не снижают восприятия текста. Диссертация объемная, превышает рекомендуемое для кандидатских диссертаций число страниц, поэтому можно было бы сократить подробное описание микробиологических методик в разделе «Методы». Однако ознакомление со всеми тонкостями использованных методов только повышает оценку работы в части ее сложности и прецизионности. В процессе ознакомления с диссертацией возникли вопросы: «Почему чувствительность тест-системы для видовой идентификации НТМБ в образцах диагностического материала выше (99,71%), чем чувствительность в образцах культур - 99,67%?» и «Планируете ли Вы проведение дальнейших исследований по расширению списка идентифицируемых видов НТМБ с помощью разработанной тест-системы?».

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, выполненная под руководством кандидата медицинских наук Смирновой Татьяны Геннадьевны, является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне, содержащей новое решение актуальной научной задачи в области микробиологии - изучение особенностей геномной структуры возбудителей инфекционных заболеваний и на этой основе создание способа быстрого выявления и дифференциации нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса, в том числе, их ко-инфекций, и способа видовой идентификации 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Устиновой Веры

Витальевны отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (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 10.02.21 № 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 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Устинова Вера Витальевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 - микробиология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник
отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии
Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы
«Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д.10, с. 1
Тел.: +7 (916) 688-98-25
e-mail: makarova75@yandex.ru

доктор биологических наук

Макарова Марина Витальевна

Подпись Макаровой Марины Витальевны заверяю:

Ученый секретарь Государственного бюджетного учреждения здравоохранения
города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с
туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д.10, с. 1
Тел.: +7 (499) 268-00-05
e-mail: cbt@zdrav.mos.ru

доктор медицинских наук



Иванова Диана Александровна

28.01.2025