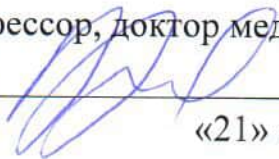


«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук,




А. Э. Эргешов
«21» февраля 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (107564,
г.Москва, Яузская аллея, д.2)

Диссертация Устиновой Веры Витальевны «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – «микробиология» (биологические науки) выполнена в отделе микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

С 2015 года, в том числе, в период подготовки диссертации, соискатель Устинова Вера Витальевна работала и работает по настоящее время в должности младшего научного сотрудника в отделе микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (г. Москва).

В 2009 году Устинова Вера Витальевна окончила биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова по специальности «зоология».

Устинова Вера Витальевна для выполнения диссертационной работы, апробации, получения заключения организации была прикреплена соискателем по специальности 1.5.11 – микробиология в отдел микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», приказ №363/1 от 10 ноября 2020г.

Справка об обучении № 421 выдана 18 ноября 2019 года Федеральным бюджетным учреждением науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

Смирнова Татьяна Геннадьевна – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», отдел микробиологии, заведующий.

По итогам обсуждения принято следующее 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, является законченным научным исследованием, выполненным на современном уровне, с использованием современных методов лабораторной диагностики.

Целью работы являлась разработка тест-систем, основанных на технологии ПЦР в режиме реального времени, для быстрого одновременного дифференциального выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса в одной пробирке и для идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида.

Автором лично проведён анализ геномов НТМБ и МБТК и разработаны праймеры и зонды для выявления и дифференциации НТМБ и МБТК и идентификации НТМБ до вида. Отбор биоматериала для исследования проведён автором совместно с сотрудниками отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»: старшим научным сотрудником, к.м.н. Смирновой Т.Г. и научным сотрудником Андриевской И.Ю.. Результаты микробиологических и молекулярно-генетических исследований по детекции нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса, их идентификации и определению видовой принадлежности получены автором совместно со старшим научным сотрудником, к.м.н. Смирновой Т.Г. и лаборантом-исследователем Киселевой Е. А.. Испытания тест-систем, разработанных в ходе диссертационного исследования, проведены автором совместно с сотрудниками отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»: старшим научным сотрудником, к.м.н. Смирновой Т.Г. и лаборантом-исследователем Киселевой Е. А.. Устиновой В.В. статистически обработаны полученные данные, обобщены и проанализированы результаты исследования, научно обоснованы выводы, результаты работы представлены на научно-практических конференциях. Совместно с главным научным сотрудником отдела микробиологии, профессором, д.б.н. Черноусовой Л.Н. и старшим научным сотрудником отдела микробиологии, к.м.н. Смирновой Т.Г. автор внедрил их в практическую работу отдела микробиологии ФГБНУ

«ЦНИИТ».

Научная новизна проведенных исследований: Выявлены новые, не использовавшиеся ранее для детекции группы нетуберкулезных микобактерий ДНК-мишени, локализующиеся в генах *meth* (4263878 – 4263784 нуклеотиды на референсном геноме *M. smegmatis* NC_008596.1) и *tuf* (785442 – 785495 референсный геном *M. tuberculosis* H37Rv NC_000962.3), позволяющие дифференцировать нетуберкулезные микобактерии от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий.

Выявлены новые, не использовавшиеся ранее ДНК-мишени, позволяющие идентифицировать 12 видов нетуберкулезных микобактерий, лежащие в локусах, соответствующих 101820-102392 нуклеотидам на референсном геноме *M. abscessus* NZ_FVOX01000008.1 и 29992-30393 нуклеотидам на референсном геноме *M. avium* NZ_LMVV01000015.

Разработана тест-система, основанная на ПЦР-РВ, для одновременного выявления и дифференциации нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса в одной пробирке, позволяющая идентифицировать нетуберкулезные микобактерии в образцах клинического материала с чувствительностью 74,2%, в образцах культур – с чувствительностью 100%. Чувствительность выявления микобактерий туберкулезного комплекса для образцов клинического материала - 93,5% и для образцов культур - 100%.

Разработана тест-система для выявления нетуберкулезных микобактерий до вида в образцах культур и клинического материала от больных, 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 для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий в образцах диагностического материала - 99,71%, чувствительность в образцах культур - 99,67% при специфичности 100%. Чувствительность и специфичность для определения микобактерий туберкулезного комплекса из культур составляет 100%.

Теоретическая значимость исследований: Предложенные для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий генетические мишени, лежащие в локусах, соответствующих 101820-102392 нуклеотидам на референсном геноме *M. abscessus* NZ_FVOX01000008.1 и 29992-30393 нуклеотидам на референсном геноме *M. avium* NZ_LMVV01000015, могут рассматриваться в качестве дополнительной основы в систематике нетуберкулезных микобактерий для построения более совершенных филогенетических деревьев.

Обоснована возможность применения мишеней, использованных для разработки тест-системы для идентификации до вида *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, для дальнейшего расширения списка идентифицируемых видов нетуберкулезных микобактерий.

Разработанные ПЦР-РВ тест-системы могут быть использованы в лабораторной диагностике, что существенно сократит время анализа образцов клинического материала и культур от больных. Отсутствие большого количества ручных манипуляций в протоколе исследования снижает вероятность возникновения ошибок, связанных с человеческим фактором.

Возможность выявления ко-инфекции нетуберкулезных микобактерий/микобактерий туберкулезного комплекса в образцах клинического материала и культур от больных с использованием разработанной тест-системы для одновременного выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса обеспечивает возможность применения правильного алгоритма определения лекарственной чувствительности и, как следствие, назначения больным с ко-инфекцией корректного режима антибиотикотерапии.

Разработанная ПЦР-РВ тест-система для видовой идентификации позволяет выявлять ко-инфекцию штаммами разных видов нетуберкулезных микобактерий, что особенно важно в случае ко-инфекции штаммами медленнорастущей и быстрорастущей нетуберкулезной микобактерии, т.к. обнаружение такой ко-инфекции культуральным методом затруднено тем, что быстрорастущие микобактерии вырастают быстрее. Отсутствию информации о присутствии второго штамма в полученной культуре, может привести к неправильному определению лекарственной чувствительности и, как следствие, назначению больному некорректного режима антибиотикотерапии.

Результаты настоящей работы внедрены в алгоритм проведения исследований образцов от пациентов лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии ФГБНУ «Центрального НИИ Туберкулёза», а также 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 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).

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе современных и адекватных биоинформатических, молекулярно-биологических и микробиологических методов, достаточной биологической повторностью, учётом и анализом результатов с использованием методов статистической обработки данных. О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки исследованных штаммов НТМБ и МБТК и образцов диагностического материала от больных.

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 IV Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2015), конференции молодых ученых с международным участием, посвященные Международному Дню борьбы с туберкулезом (Москва, 2016, 2017), 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).

По данным проведенных исследований опубликовано 10 печатных работ, из них 5 в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК, 5 - в сборниках материалов конференций и в других изданиях. Диссертационная работа изложена на 202 листах машинописного текста, иллюстрирована 21 таблицей и 8 рисунками.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

Статьи в журналах

1. Устинова В. В. Выявление и дифференциация нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР в режиме реального времени. / В. В. Устинова, Т. Г. Смирнова, Д. А. Варламов, И. Ю. Андриевская, Е. Е. Ларионова, Л. Н. Черноусова // Туберкулёз и болезни лёгких. - 2016. – Т. 94. - № 9. – С. 80-94.

2. Смирнова Т. Г. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия). / Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская, В. В. Устинова, Л. Н. Черноусова // Туберкулез и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95. - №5. – С. 54-59.

3. Ustinova V. V. New assay to diagnose and differentiate between Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria. / V. V. Ustinova, T. G. Smirnova, D. G. Sochivko, D. A. Varlamov, E. E. Larionova, S. N. Andreevskaya, I. Y. Andrievskaya, E. A. Kiseleva, L. N. Chernousova, A. Ergeshov // Tuberculosis (Edinb). – 2019. – Vol. 114. – P. 17-23.

4. Smirnova T. Evaluation of a new assay for nontuberculous mycobacteria species identification in diagnostic material and cultures. / T. Smirnova, V. Ustinova, S. Andreevskaya, E. Larionova, E. Kiseleva, L. Chernousova, D. Varlamov, D. Sochivko, A. Ergeshov // Tuberculosis (Edinb). – 2021. – Vol.130: 102124.

5. Смирнова, Т. Г. Дискриминирующая способность метода мультиплексной ПЦР при выявлении микобактериальной коинфекции. / Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская, В. В. Устинова, Е. Е. Ларионова, Е. А. Киселева, Л. Н. Черноусова, А. Эргешов // Bulletin of Russian State Medical University / Вестник Российского Государственного Медицинского Университета. - 2024. - №4. - С. 40–45.

Тезисы

1. Устинова В. В. Разработка ПЦР тест-системы для ускоренной дифференциации нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса. // Сборник трудов Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом. – Москва. – 2016. – С.108-110.

2. Черноусова Л. Н. Двухэтапная дифференциация микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий. / Л. Н. Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Андриевская И.Ю., Устинова В. В., Ларионова Е. Е., Эргешов А.Э. // Инфекционные болезни (Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва). – 2017. – Том 15. – Приложение №1. – С. 309.

3. Ergeshov A. Express detection and differentiation of M. tuberculosis and nontuberculous mycobacteria in samples. / A. Ergeshov, T. Smirnova, V. Ustinova, I. Andrievskaya, S. Andreevskaya, E. Larionova, L. Chernousova // Materials of ERS International Congress, Milan. - 2017 — p. 3501

4. Ustinova V. Prevalence and diversity of nontuberculous mycobacteria in different regions of the Russian Federation. / V. Ustinova, T. Smirnova, E. Larionova, I. Andrievskaya, E. Kiseleva, S. Andreevskaya, L Chernousova. // Russian Journal of

Infection and Immunity (Proceedings of International conference, dedicated to the 110th anniversary of St. Petersburg Pasteur Institute and to the 95th anniversary of naming the Institute after Pasteur. Molecular bases of epidemiology, diagnostics, prevention and treatment of infectious diseases). – 2018 - vol. 8, №4 - P.583.

5. Устинова В. В. / Разработка тест-системы на основе технологии ПЦР в режиме реального времени для видовой идентификации НТМБ. // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2019. - № 1. - С. 78 – 80.

Диссертация Устиновой Веры Витальевны «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Заключение принято на совместном заседании отделов микробиологии, иммунологии, патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, отдела дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

Присутствовало на заседании 18 человек. Результаты голосования: «за» - 18 человек, «против» - 0 человек, «воздержалось» - 0 человек, протокол №1 от 20 декабря 2023 г.

Председатель:

доктор биологических наук, профессор

главный научный сотрудник отдела микробиологии

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Центральный научно-исследовательский

институт туберкулеза»

Черноусова Лариса Николаевна

Подпись Черноусовой Ларисы Николаевны удостоверяю:

ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Центральный научно-исследовательский

институт туберкулеза»

кандидат психологических наук



Золотова Наталья Владимировна