

Заключение комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по кандидатской диссертации Устиновой Веры Витальевны на тему «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11 – Микробиология.

Научный руководитель:

Смирнова Татьяна Геннадьевна – кандидат медицинских наук (03.00.07 – микробиология), заведующий отделом микробиологии Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГБНУ «ЦНИИТ»).

Диссертационная работа Устиновой В.В. соответствует специальности: 1.5.11 – Микробиология (биологические науки).

Работа посвящена разработке систем, основанных на ПЦР в режиме реального времени, позволяющих усовершенствовать молекулярно-генетическую диагностику туберкулеза и микобактериоза.

В результате диссертационного исследования Устиновой В.В. были 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. С использованием выявленных мишеней разработана и охарактеризована стандартными методиками тест-система, основанная на ПЦР в режиме реального времени, 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%. Выявлены новые, не использовавшиеся ранее ДНК-мишени, позволяющие идентифицировать 12 видов нетуберкулезных микобактерий, лежащие в локусах, кодирующих белки с неизвестными функциями, соответствующих 101820-102392 нуклеотидам на референсном геноме *M. abscessus* NZ_FVOX01000008.1 и 29992-30393 нуклеотидам на референсном геноме *M. avium* NZ_LMVV01000015. Эти мишени легли в основу разработанной в ходе диссертационного исследования и охарактеризованной с использованием стандартных методик тест-системы, основанной на ПЦР в режиме реального времени, для идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида в образцах культур и клинического материала от больных. Разработанная тест-система позволяет 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 составила 99,71%, чувствительность в образцах культур - 99,67% при специфичности 100%.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что выявленные в ходе диссертационного исследования ДНК-мишени для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий могут рассматриваться в качестве дополнительной основы в систематике нетуберкулезных микобактерий для построения более совершенных филогенетических деревьев в комплексе с уже использующимися для этого локусами. 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.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработаны ПЦР тест-системы для дифференциации нетуберкулезных микобактерий от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий и для идентификации 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий, характеристики которых позволяют применять их в лабораторной диагностике. Их внедрение существенно сократит время анализа образцов клинического материала и культур от больных, а отсутствие большого количества ручных манипуляций в протоколе исследования снизит вероятность ошибок, связанных с человеческим фактором. Возможность выявления ко-инфекции нетуберкулезными микобактериями и микобактериями туберкулезного комплекса и ко-инфекции разными видами нетуберкулезных микобактерий в образцах клинического материала и культур от больных при анализе образцов разработанными тест-системами обеспечивает возможность применения правильного алгоритма определения лекарственной чувствительности и, как следствие, назначения больным с ко-инфекцией корректного режима антибиотикотерапии.

Результаты настоящей работы внедрены в алгоритм проведения исследований образцов от пациентов лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии Федерального Государственного Бюджетного Научного Учреждения «Центрального НИИ Туберкулёза», а также используются в цикле лекций курса повышения квалификации врачей-бактериологов, врачей клинической лабораторной диагностики и врачей фтизиатров учебного центра Федерального Государственного Бюджетного Научного Учреждения «Центрального НИИ Туберкулёза» (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 методов 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).

Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов исследований, адекватных поставленным задачам. Достоверность полученных результатов основана на достаточном объеме выборки исследуемых образцов, применении современных и традиционных микробиологических и молекулярно-генетических методов, корректно проведенным статистическим анализом данных. Научные положения и выводы, сформулированные Устиновой В.В., логически вытекают из результатов, полученных в ходе диссертационного исследования.

По объему проведенных исследований, их новизне и практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11 – Микробиология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Отчет о проверке на заимствования с помощью системы «Антиплагиат» на сайте www.antiplagiat.ru показал, что оригинальность текста составляет 85,55%, самоцитирование – 8%, цитирование 0,27%, совпадения – 6,18%.

Диссертация содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 - в рецензируемых научных изданиях, 5 - в материалах конференций (тезисы).

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

1. Макарова Марина Витальевна – доктор биологических наук (03.02.03 – микробиология), 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»
2. Ермолова Екатерина Ивановна – кандидат биологических наук (03.02.03 – микробиология; 1.5.11 - биотехнология), 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

Согласия оппонентов имеются.

Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01. рекомендует диссертацию Устиновой Веры Витальевны на тему «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса» по специальности: 1.5.11 – микробиология к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01:

Председатель:

Главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,

доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ

С.С. Афанасьев

Члены комиссии:

Руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,

доктор медицинских наук, профессор

О.Ю. Борисова

Руководитель отдела медицинской биотехнологии

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,

доктор биологических наук, доцент

Е.А. Воропаева

Руководитель клинического отдела

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,

доктор медицинских наук

Н.И. Леонтьева