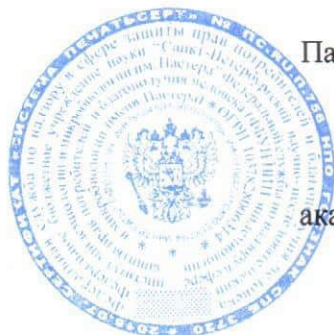


УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



академик РАН  Тотолян А.А.

«21»  2025 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы 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 выполненной работы

В соответствии с данными Всемирной Организации Здравоохранения отмечают мировой рост заболеваемости туберкулезом и микобактериозом. Ввиду сходства клинической картины этих заболеваний больные микобактериозом проходят диагностику и лечение в противотуберкулезных учреждениях. При этом для нетуберкулезных микобактерий характерна резистентность к большинству противотуберкулезных препаратов, поэтому схемы лечения микобактериоза принципиально отличаются от таковых для туберкулеза. Отличаются и схемы лечения заболеваний, вызванных разными видами нетуберкулезных микобактерий. Это обуславливает востребованность инструментов быстрого выявления, дифференциации нетуберкулезных микобактерий от микобактерий туберкулезного комплекса и их видовой идентификации. Молекулярно-генетические тест-системы, использовавшиеся ранее на территории Российской Федерации для этих целей, основанные на технологии обратной гибридизации ДНК с зондами, иммобилизованными на нитроцеллюлозном носителе, больше не

поставляются в Россию. На данный момент для использования в медицинских организациях на территории Российской Федерации зарегистрирована одна молекулярно-генетическая тест-система, основанная на технологии ПЦР в режиме реального времени, для выявления и дифференциации нетуберкулезных микобактерий от микобактерий туберкулезного комплекса (ООО «ТестГен», 2023), а тест-системы для их видовой идентификации не представлены.

Таким образом, диссертационная работа Устиновой Веры Витальевны посвящена актуальной проблеме разработки молекулярно-генетических тест-систем, основанных на технологии ПЦР в режиме реального времени, для выявления нетуберкулезных микобактерий, их дифференциации от микобактерий туберкулезного комплекса и видовой идентификации.

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

Научная новизна диссертационного исследования заключается в выявлении новых ДНК-мишеней, позволяющих дифференцировать нетуберкулезные микобактерии от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий, локализующихся в генах *metH* (4263878 – 4263784 нуклеотиды на референсном геноме *M. smegmatis* NC_008596.1, NCBI) и *tuf* (785442 – 785495 референсный геном *M. tuberculosis* H37Rv NC_000962.3, NCBI), а также новых, не использовавшихся ранее ДНК-мишеней, позволяющих идентифицировать 12 видов нетуберкулезных микобактерий, лежащих в локусах, соответствующих 101820-102392 нуклеотидам на референсном геноме *M. abscessus* NZ_FVOX01000008.1, NCBI и 29992-30393 нуклеотидам на референсном геноме *M. avium* NZ_LMVV01000015, NCBI.

Автором впервые разработана тест-система, основанная на технологии ПЦР в режиме реального времени, позволяющая выявлять и дифференцировать друг от друга в одной пробирке ДНК нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса, включая случаи ко-инфекции. Чувствительность выявления нетуберкулезных микобактерий в образцах клинического материала - 74,2%, в образцах культур – 100%. Чувствительность выявления микобактерий туберкулезного комплекса в образцах клинического материала - 93,5% и в образцах культур - 100%.

Автором впервые разработана тест-система для идентификации 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 клинического материала составила 99,71%, чувствительность в образцах культур - 99,67% при специфичности 100%. Чувствительность и специфичность для определения микобактерий туберкулезного комплекса из культур составила 100%.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Исследование выполнено в рамках НИР «Геномное секвенирование клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий, распространенных в РФ» (уникальный номер 0515-2015-0011).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Предложенные автором генетические мишени для выявления нетуберкулезных микобактерий и их дифференциации от микобактерий туберкулезного комплекса и других родственных кислотоустойчивых бактерий (*Nocardia*, *Rhodococcus*) могут быть использованы с другими общепринятыми локусами в качестве дополнительной основы в систематике нетуберкулезных микобактерий.

Автором 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.

Автором показана возможность применения разработанных в результате диссертационного исследования тест-систем в лабораторной диагностике, что существенно сократит время анализа образцов клинического материала и культур от больных, а также снизит вероятность возникновения ошибок, связанных с человеческим фактором, благодаря отсутствию в протоколе исследования большого количества ручных манипуляций.

Автором показана возможность выявления ко-инфекции нетуберкулезными микобактериями/микобактериями туберкулезного комплекса, а также ко-инфекции двумя разными видами нетуберкулезных микобактерий в образцах клинического материала что обеспечивает возможность применения корректного алгоритма определения лекарственной чувствительности и назначения эффективного режима антибиотикотерапии.

Анализ образцов клинического материала и культур от больных с использованием разработанных в результате диссертационного исследования тест-систем внедрён в алгоритм исследования образцов в лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии ФГБНУ «Центрального НИИ Туберкулёза» (акт внедрения ФГБНУ «ЦНИИТ» от

14.01.2023). Материал исследования используется 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 диссертационного исследования легли в основу разработки набора реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий и дифференциальной диагностики видов нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР-РВ и были использованы в 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 и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность полученных Устиновой В.В. результатов обеспечена использованием в работе адекватных задачам биоинформатических, молекулярно-генетических, микробиологических и статистических методов исследования, наличием средств для валидации полученных результатов и сравнительных исследований.

Диссертантом опубликовано 10 научных работ, из них 5 – в материалах конференций и 5 – в рецензируемых научных 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.).

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанные в результате диссертационной работы тест-системы рекомендуются к использованию в диагностических лабораториях при лечебных учреждениях соответствующего профиля для увеличения скорости анализа образцов и повышения эффективности лечения микобактериоза. Отобранные в результате разработки тест-системы для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий локусы рекомендуется использовать для дальнейшего расширения панели идентифицируемых видов нетуберкулезных микобактерий.

Соответствие специальностям

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы, сформулированные автором, соответствуют специальности 1.5.11 – микробиология.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация изложена на 200 страницах машинописного текста и иллюстрирована 21 таблицами и 8 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, четырех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки, списка сокращений, списка литературы (325 источника, из них 60 – отечественные, 265 – зарубежные) и семи приложений.

Содержание работы соответствует поставленной цели, выводы – задачам исследования.

Автореферат соответствует структуре и содержанию диссертации и оформлен согласно требованиям ВАК.

Принципиальных замечаний к работе нет, но есть ряд вопросов дискуссионного характера:

1. В описании литературы по методам детекции видов нетуберкулезных микобактерий есть неточность. На с. 9 автор пишет «Принцип обратной гибридизации также использовали для разработки ... гидрогелевых чипов низкой плотности [324] с варибельным фрагментом гена *groB* в качестве мишени.». Есть упоминание про чипы, но с геном *groB* в качестве мишени и ссылка 324 (Зименков и соавторы 2015). Однако в работе Зименкова и соавторов идет речь о другом гене - *gyrB* (Zimenzkov et al. J Clin Microbiol. 2015 Apr;53(4):1103-14. doi: 10.1128/JCM.02579-14.)

Для информации, те же авторы совсем недавно опубликовали расширенный и валидированный вариант чипа для детекции не 35 (как было в их предыдущей работе процитированной выше), а 79 видов НТМ (Zimenzkov et al. Int J Mol Sci. 2024 Dec 8;25(23):13200. doi: 10.3390/ijms252313200).

2. С. 24. В разделе Методы автор пишет: «Расчёт чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного результата (PPV – positive prognostic value) и прогностической ценности отрицательного результата (NPV – negative prognostic value) проводили по стандартным формулам [41].»

Правильная английская расшифровка PPV / NPV - Positive / negative predictive values

3. С.30. Обзор литературы.

Автор перечисляет виды *M. tuberculosis* complex - *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* *M. microti*. Помимо перечисленных есть и другие животные экотипы – *M. orygis*, *M. suricattae*, *M. mungi*. Про них также можно было бы коротко упомянуть.

Сделанные замечания не затрагивают основного содержания рассматриваемой диссертации и не влияют на общую высокую оценку научного уровня и выполненной диссертантом работы.

Отзыв на диссертацию Устиновой Веры Витальевны обсужден и одобрен на заседании Проблемной комиссии по микробиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Протокол № 01/25 от 17 января 2025 года).

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 Смирновой Татьяны Геннадьевны, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи – совершенствование молекулярно-генетических методов выявления, дифференциации и видовой идентификации 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.

Заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Адрес: г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14

Телефон: 8 (812) 644-63-80

Электронная почта: igormokrousov@pasteurorg.ru

доктор биологических наук

Мокроусов Игорь Владиславович

Подпись Мокроусова И.В. удостоверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.м.н.

Адрес: г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14

Телефон: 8 (812) 644-63-18

Электронная почта: trifonovagt@pasteurorg.ru

кандидат медицинских наук

Трифонова Галина Федоровна

Дата: 20 января 2025 г.

