

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.004.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ 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 ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 13 февраля 2025г. протокол № 1.

О присуждении Устиновой Вере Витальевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса» по специальности 1.5.11. – Микробиология (биологические науки) принята к защите 11.12.2024 г. протокол № 3 диссертационным советом 64.1.004.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10). Диссертационный совет утвержден Приказом Министерства образования и науки РФ № 714/нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ №791/нк от 09.12.2020г. част. изм., приказ № 1040/нк от 13.10.2021г. част. изм., приказ № 214/нк от 12.03.2024г. част. изм.

Соискатель Устинова Вера Витальевна, 1987 года рождения. В 2009 г. окончила Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова по специальности «Зоология» (диплом № ВСГ 4310027).

С 2015 года, в том числе, в период подготовки диссертации, Устинова Вера Витальевна работает и по настоящее время в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» г. Москва в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии.

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.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

Научный руководитель:

Смирнова Татьяна Геннадьевна – кандидат медицинских наук (03.00.07 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», отдел микробиологии, заведующий

Официальные оппоненты:

Макарова Марина Витальевна – доктор биологических наук (03.02.03 – микробиология), Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», отдел проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, главный научный сотрудник

Ермолова (Аксенова) Екатерина Ивановна – кандидат биологических наук (03.02.03 – микробиология; 1.5.11 - биотехнология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория анализа геномов, старший научный сотрудник – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: 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, доктор биологических наук Мокроусов Игорь Владиславович, лаборатория молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики, заведующий, в своем положительном заключении указали, что диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи - совершенствование молекулярно-генетических методов выявления, дифференциации и видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий.

Соискатель имеет 10 печатных работ по теме диссертации, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, 5 тезисов в сборниках научных трудов и материалах конференций, общим объемом 43 страницы и с авторским вкладом 37 страниц.

Основные работы: 1) 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 // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, №5. – С. 54-59; 2) 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; 3) 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; 4) 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

На диссертацию и автореферат поступило 4 положительных отзыва без замечаний от: 1) к.б.н. Алкалаевой Елены Зиновьевны, заведующей лабораторией, ведущего научного сотрудника лаборатории механизмов и контроля трансляции ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук; 2) к.б.н. Зарипова Михаила Махмудовича, заведующего лабораторией клеточной инженерии, научного сотрудника ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук; 3) к.б.н. Гончаренко Анны Владимировны, руководителя группы редактирования геномов микроорганизмов ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»; 4) к.м.н. Поликарповой Светланы Вениаминовны, заведующей бактериологической лабораторией ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 имени О.М. Филатова» Департамента здравоохранения Москвы. В отзывах отмечено, что в ходе диссертационного исследования получены перспективные решения в области молекулярно-генетической диагностики микобактериоза. В отзыве к.б.н. Гончаренко Анны Владимировны, руководителя группы редактирования геномов микроорганизмов ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», имеется замечание, касаемое «номенклатуры *Mycobacterium smegmatis*, который отнесен недавно к роду *Mycolicibacterium*, которое не снижает ценность диссертационной работы». Диссертант в ходе проведения защиты ответила на данное замечание.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывался тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в изучении значимых для здоровья человека патогенов и методов их исследования.

Диссертационный совет отметил, что на основании выполненных соискателем исследований разработаны тест-системы, основанные на технологии ПЦР в режиме реального времени, для дифференциальной диагностики микобактериоза и туберкулеза и видовой идентификации 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий. **Предложены** не использовавшиеся ранее для детекции группы нетуберкулезных микобактерий ДНК-мишени, позволяющие идентифицировать нетуберкулезные микобактерии и дифференцировать их от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий, а также предложены новые ДНК-мишени, позволяющие идентифицировать 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий. **Доказана** возможность детекции ДНК нетуберкулезных микобактерий с помощью разработанной автором тест-системы непосредственно в образцах клинического материала от больных без предварительного получения культур. **Введены** в практику новые наборы реагентов, предназначенные для совершенствования молекулярно-генетической диагностики микобактериоза и туберкулеза.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказана возможность использования найденных автором ДНК-мишеней для дальнейшего расширения списка идентифицируемых видов нетуберкулезных микобактерий.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформатических и статистических методов исследования. **Изложены** принципы и этапы разработки молекулярно-генетических тест-систем, предназначенных для дифференциальной диагностики микобактериоза и туберкулеза, и экспериментальные условия, необходимые для их оптимальной работы. **Раскрыты** принципы, этапы и закономерности подбора и тестирования праймеров и TaqMan зондов для получения оптимального сочетания их физико-химических характеристик и обеспечения их совместимости в мультиплексных реакционных смесях для проведения ПЦР в режиме реального времени. **Изучены** последовательности ДНК консервативных в пределах группы нетуберкулезных микобактерий локусов, позволяющие дифференцировать их от микобактерий туберкулезного комплекса, и последовательности ДНК для 12 видов нетуберкулезных микобактерий, достаточно консервативные для их использования в видовой идентификации методом ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентных зондов типа TaqMan. **Проведена модернизация** метода молекулярно-генетической диагностики микобактериоза, обеспечивающая возможность одновременного выявления микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий и их дифференциальную диагностику.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработаны две молекулярно-генетические тест-системы и их использование **внедрено** в алгоритм проведения анализа образцов от пациентов лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии ФГБНУ «Центрального НИИ Туберкулёза» (Акт внедрения ФГБНУ «ЦНИИТ» от 14.01.2023); результаты, полученные соискателем, 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 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). **Определены** перспективы внедрения разработанных тест-систем в алгоритм молекулярно-генетической диагностики образцов от пациентов, проходящих обследование и/или лечение в противотуберкулезных учреждениях. **Создано** пять мультиплексных реакционных смесей для проведения ПЦР в режиме реального времени, позволяющих одновременно выявлять для каждой по четыре разные ДНК-мишени. **Представлены** оригинальные последовательности 29ти праймеров и 19ти TaqMan зондов для проведения ПЦР в режиме реального времени, оригинальные праймеры для секвенирования по Сенгеру использованных в работе генетических локусов и их стандартные характеристики.

Оценка достоверности результатов исследования показала, что для экспериментальных работ объем полученных данных является достаточным, методы статистической обработки подобраны адекватно, эксперименты проведены на высоком, современном научно-методическом уровне. Воспроизводимость и сходимость результатов, полученных с использованием разработанных тест-систем, показана для разных моделей амплификаторов. **Теория** исследования построена на известных данных и согласуется с

опубликованными экспериментальными данными, посвященными разработке молекулярно-генетических методов диагностики микобактериоза и видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий. **Идея базируется** на обобщении передового мирового опыта разработки молекулярно-генетических тест-систем и анализе возможности применения новых генетических мишеней, обеспечивающих одновременное дифференциальное выявление нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса в одном образце диагностического материала. **Использовано** сравнение литературных и авторских данных по разработке и валидации тест-систем, основанных на ПЦР в режиме реального времени, для выявления нетуберкулезных микобактерий, микобактерий туберкулезного комплекса и тест-систем для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий. **Установлена** сопоставимость данных в части чувствительности и специфичности разработанных тест-систем с таковыми для зарубежных тест-систем, основанных на аналогичной технологии и решающих сходный спектр задач, известных по литературным данным, при имеющихся преимуществах тест-систем, разработанных автором. **Использованы** современные микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы.

Личный вклад соискателя заключается в проведении анализа геномов НТМБ и МБТК с выбором локусов для дальнейшей разработки тест-систем, разработке праймеров для секвенирования с целью валидации отобранных локусов, составлении и анализе выравниваний исследуемых геномных областей, разработке праймеров и зондов 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».

На заседании 13 февраля 2025 года диссертационный совет принял решение - за разработку тест-систем ПЦР в режиме реального времени, позволяющих проводить дифференциальную диагностику микобактериоза и туберкулеза и видовую идентификацию 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий, имеющую существенное значение для развития страны в области совершенствования молекулярно-генетической диагностики микобактериозов,

присудить Устиновой Вере Витальевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности: 1.5.11. – Микробиология (биологические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 докторов, из них 11 докторов наук по специальности 1.5.11 – Микробиология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 16, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Алешкин Владимир Андрианович

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

14.02.2025 г.

