

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Быкова Анатолия Сергеевича на диссертационную работу Носовой Елены Юрьевны на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология

### Актуальность темы исследования

Продолжающееся развитие лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам и повсеместное распространение таких штаммов как в мире, так и в Российской Федерации является главной проблемой современной фтизиатрии. Показатели заболеваемости туберкулёзом характеризуются увеличением доли больных как с множественной, так и с широкой лекарственной устойчивостью, а также появлением случаев с тотальной лекарственной устойчивостью ко всем антибактериальным препаратам. На создавшуюся эпидемиологическую ситуацию отрицательное влияние оказывает рост числа пациентов с ВИЧ-инфекцией, мигранты, а также лица без определённого местожительства. В создавшихся условиях быстрая диагностика лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам является актуальной задачей микробиологических лабораторий противотуберкулёзных учреждений. Ключевая роль в диагностике туберкулёза принадлежит молекулярно-генетическим и бактериологическим методам исследования.

Вместе с тем, развитие лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза носит сложный мультилокусный характер, характеризующийся появлением новых генетических детерминант устойчивости, ассоциированных с формированием резистентности различного уровня. Очевидно, что диагностический потенциал, имеющихся в настоящее время в рутинной практике молекулярно-генетических и бактериологических методов, ограничен и не в полной мере позволяет адекватно проводить диагностику лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*.

В связи с этим, диссертационная работа Носовой Елены Юрьевны, посвящённая изучению генетических и фенотипических свойств устойчивых штаммов *M.tuberculosis*, связанных с различным уровнем резистентности к антибактериальным препаратам, а также разработке и внедрению алгоритма ускоренной качественной и количественной микробиологической диагностики лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза, является без сомнения актуальной и своевременной.

### **Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Автором впервые с помощью разработанных молекулярно-генетических методик (ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ) определена детерминирующая роль мутаций в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis* в развитии устойчивости к основным препаратам резервного ряда - фторхинолонам и инъекционным препаратам. Разработанные методики позволяют увеличить спектр анализируемых мутаций в исследуемых генах. Получены новые данные о частоте встречаемости мутаций в генах *gyrA/gyrB*, ассоциированные с различной степени устойчивости к офлоксацину, левофлоксацину и моксифлоксацину. Установлены различия в уровне устойчивости *M.tuberculosis* к инъекционным препаратам в штаммах с мутациями в *rrs* и промоторной области гена *eis*.

Исследование чувствительности *M.tuberculosis* к основным препаратам первого ряда позволило впервые установить мутации, связанные с высоким и умеренным уровнем устойчивости к рифампицину, в преобладающем большинстве штаммов (89,9%), и шесть типов мутаций и три двойные с «промежуточной» степенью устойчивости к препарату. Не выявлены различия в степени устойчивости к изониазиду и этамбутолу. По результатам исследования 97% устойчивых изолятов с мутациями в генах *katG*, *ahpC* и *inhA* к изониазиду, обуславливают высокую или умеренную степень устойчивости и 88% изолятов с различными мутациями в *embB* обуславливают «промежуточную» устойчивость к этамбутолу. Среди штаммов с множественной лекарственной устойчивостью часто встречаемыми установлены штаммы с мутациями S531L в *rpoB* и S315T в

*katG*, ассоциированные с умеренной и высокой степенью устойчивости к рифампицину и изониазиду.

В диссертационной работе доказана необходимость включения в алгоритм лабораторной диагностики туберкулёза количественного определения лекарственной чувствительности возбудителя к препаратам основного (рифампицин, изониазид, этамбутол) и резервного ряда (фторхинолоны, инъекционные препараты) в комплексе с молекулярно-генетическим определением генетических детерминант устойчивости для получения наиболее достоверной информации о характере и степени устойчивости возбудителя к ключевым препаратам.

Представленные в диссертационной работе положения, выводы и практические рекомендации обоснованы и соответствуют результатам, проведённых исследований.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в получении автором новых сведений о спектре и частоте встречаемости мутаций, приводящих к различной степени устойчивости *M.tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда, которые позволяют дополнить фенотипическую характеристику устойчивых штаммов и объяснить получаемые несоответствия в бактериологическом и молекулярно-генетическом определении лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Полученные автором данные молекулярного изучения устойчивых штаммов *M.tuberculosis* на теоретической основе могут быть использованы для совершенствования микробиологической диагностики туберкулёза с применением современных молекулярно-генетических и бактериологических технологий для качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза.

Диссертационная работа имеет высокую практическую значимость. Автором с помощью разработанных молекулярных методик и секвенирования установлены клинически значимые типы мутаций и их сочетания в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, приводящие к развитию устойчивости *M.tuberculosis* к основным препаратам резервного ряда. Применение разработанных методик позволяет увеличить спектр

анализируемых мутаций и повысить надёжность получаемых результатов выявления генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину.

Важное практическое значение имеют полученные данные ассоциации мутаций с уровнем устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам, что делает возможным более точно характеризовать устойчивость возбудителя по сравнению с результатами в Bactec MGIT 960. Автор обосновал применение «критической концентрации» 0,25 мкг/мл при тестировании лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к моксифлоксацину в Bactec MGIT 960, позволяющее увеличить корреляцию с молекулярно-генетическим определением чувствительности к препарату. Особое практическое значение имеют полученные данные о диагностической эффективности применения молекулярных технологий при исследовании операционного материала у больных без бактериовыделения для адекватного назначения химиотерапии в послеоперационный период.

Для внедрения в практику микробиологических лабораторий фтизиатрического профиля разработан алгоритм комплексной лабораторной диагностики качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов. Предложенный алгоритм для диагностики туберкулёза сокращает время получения результатов, повышает достоверность результатов определения лекарственной чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам и служит основанием для назначения адекватной химиотерапии.

#### **Достоверность и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Она подтверждается использованием теоретически обоснованных методических подходов, адекватным поставленной цели и задачам исследования; применением комплекса современных молекулярно-генетических и бактериологических методов, отличающихся высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью. Достоверность результатов исследований подчеркивается

обширным объёмом проанализированных и систематизированных автором данных исследования 1516 клинических изолятов микобактерий туберкулеза и 1551 проб респираторного и резекционного материала лёгких и выделенной из них 3067 проб ДНК, а также большим объёмом молекулярно-генетических и бактериологических исследований биоматериалов, полученных от 2657 пациентов с подозрением на заболевание и больных с различными формами туберкулёза. Полученные результаты исследования обработаны с помощью современных статистических методов.

Результаты исследования были доложены на 10 международных, всероссийских и региональных конференциях. По материалам диссертационного исследования автором опубликовано 41 печатная работа, в том числе в 21 статья в рецензируемых изданиях, 1 работа в коллективной монографии, 2 методических рекомендациях. Получено 4 патента на изобретение РФ.

#### **Оценка содержания, завершённости и оформление диссертации**

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК к докторским диссертациям. Она содержит 311 страниц машинописного текста и состоит из введения, обзора данных литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и литературы, содержащей 366 источников отечественных и зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 58 таблицами.

Во введении автор даёт представление об актуальности и степени разработанности темы исследования, формулирует цель и задачи, обобщает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, излагает методологию и методы собственных исследований, положения, выносимые на защиту. Описан личный вклад автора в выполнение исследования. Представленные материалы и методы дают полное представление об объёме материала, а широкий диапазон использованных методов свидетельствует о высоком методическом уровне работы.

Автором подробно описаны молекулярно-генетические, микробиологические и статистические методы исследования, использованные в работе для

исследования клинического материала от больных туберкулезом и характеристики *M.tuberculosis*. Данные материалы работы показывают широкий диапазон современных методик, освоенных автором.

В обзоре данных литературы, состоящим из введения, трех подразделов и заключения, представлены современные данные о лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, методах определения его лекарственной чувствительности к антибактериальным препаратам и методах определения его генетических детерминант устойчивости. Обзор написан полно. Данные литературы эффективно используются при обсуждения полученных результатов.

Результаты **собственных исследований** подробно представлены в трех главах. В главе о возможности применения различных молекулярно-генетических методов в диагностике лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам приводятся результаты определения; чувствительности возбудителя к фторхинолонам с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2»; чувствительности к фторхинолонам с помощью разработанных модификаций метода конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов (ПЦР-SSCP) в генах *gyrA* и *gyrB*. Приводятся данные по типам мутаций в генах *gyrA/B* и уровню устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам. Автором изучена чувствительность *M.tuberculosis* к аминогликозидам и капреомицину с помощью разработанной методики на основе метода ПЦР-ПДРФ. Исследована роль гена *eis* в развитии лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* к канамицину и чувствительность возбудителя к основным препаратам первого и второго ряда в диагностическом материале с помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ».

В следующей главе приводятся результаты изучения эффективности молекулярно-генетических технологий (тест-систем «Xpert MTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП-1» и «GenoType MTBDRplus») и оптимизации их применения в лабораторной диагностике туберкулёза.

Последняя глава собственных исследований посвящена разносторонней оценке лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам молекулярно-генетическим и бактериологическими методами.

Изложенные в диссертации сведения полностью отражают содержание работы и основаны на полученных автором результатах. Диссертационная работа Носовой Е.Ю. представляет собой завершённую научную работу, характеризующуюся новизной полученных данных и практической ценностью.

#### **Соответствие специальности**

Диссертационная работа, выполненная Носовой Е.Ю., по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам соответствует паспорту специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки) со следующими областями исследований: пункты 2 «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и 4 «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

#### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по оформлению и содержанию работы Елены Юрьевны Носовой нет. Следует отметить излишнюю «загруженность» работы большим количеством таблиц (некоторые из них можно разместить в приложении к работе, с соответствующей ссылкой).

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Елены Юрьевны Носовой на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики» является законченным научным трудом, в котором автором на основании выполненных обширных исследований решена научно-практическая проблема по изучению клинически значимых мутаций, ассоциированных с разным уровнем резистентности возбудителя туберкулёза к основным препаратам первого и второго ряда, совершенствованию молекулярно-генетической и бактериологической диагностики, что позволило разработать алгоритм комплексной лабораторной диагностики с качественной и количественной оценкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов.

Диссертационная работа Елены Юрьевны Носовой на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики», представленная на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объёму проведённых исследований соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, № 426 от 20.03.2021 «О внесении изменений в Положение о присуждении учёных степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора медицинских наук, а её автор Носова Елена Юрьевна заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология.

#### **Официальный оппонент**

Профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; Сеченовский университет)

Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

тел.: 8 (499) 248-05-53; e-mail: [drbykov@bk.ru](mailto:drbykov@bk.ru)

Доктор медицинских наук, профессор

(Быков Анатолий Сергеевич)



Подпись Быкова Анатолия Сергеевича, заверяю



28 сентября 2021