

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 ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 2021 г. № 7.

О присуждении Носовой Елене Юрьевной, гражданке Российской Федерации, ученой степени доктора медицинских наук.

Диссертация «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики» по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки) принята к защите 09 августа 2021 протокол № 4 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., 791/нк от 09.12.2020 г. част. изм., приказ № 1040/нк от 13.10.2021 част. изм.,

Соискатель Носова Елена Юрьевна, 1968 года рождения. В 1991 году окончила 2 ой Московский ордена Ленина государственный медицинский институт им. Н.И. Пирогова по специальности «Биофизика», квалификация «Врач-биофизик». Диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Молекулярно-генетическое определение *Mycobacterium tuberculosis* у больных различными формами туберкулёза» по специальности 03.00.07- микробиология защитила в 2002 году в диссертационном совете Д 208.046.01, созданном на базе Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (диплом КТ № 074567). Носова Елена Юрьевна в период подготовки диссертации и по настоящее время работает в должности ведущего научного сотрудника в отделе проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

Диссертация выполнена в отделе проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

Научный консультант: Литвинов Виталий Ильич - доктор медицинских наук (03.03.03 – иммунология), профессор, академик РАН, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», научный руководитель.

Официальные оппоненты: Мавзютов Айрат Радикович – доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий кафедрой; Чернуха Марина

Юрьевна – доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций, руководитель лаборатории; Быков Анатолий Сергеевич – доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, профессор кафедры – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в своем положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук, профессором Михайловой Натальей Александровной, руководителем научного направления по иммунобиотехнологии, заведующей отделом микробиологии, указала, что диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований, а также теоретических и научно-практических разработок осуществлено решение актуальной научной проблемы совершенствования лабораторной диагностики туберкулёза путём внедрения новых методических подходов детекции широкого спектра генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*, количественной бактериологической характеристики уровней устойчивости возбудителя к основным препаратам первого и второго ряда и разработке алгоритма ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза с применением современных бактериологических методов и молекулярно-генетических технологий для адекватного определения лекарственной чувствительности.

Соискатель имеет 41 опубликованную работу, в том числе, 21 – в рецензируемых научных изданиях, 7 – в других изданиях, 5 тезисов – в рецензируемых изданиях и 7 тезисов – в сборниках трудов и материалах конференций, 1 раздел – в коллективной монографии. Опубликовано 2 методических рекомендаций, получено 4 патента на изобретение РФ. Общий объем научных публикаций по теме диссертации составляет 192 страниц и авторским вкладом – 157 страниц.

Наиболее значимые работы: 1). Носова, Е.Ю. Молекулярно-биологический микрочип ТБ-БИОЧИП-2 для определения чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью к фторхинолонам у больных с впервые выявленным и хроническим течением туберкулёза / Е.Ю. Носова, К.Ю. Галкина, О.В. Антонова, Ю.Ю. Гармаш, О.И. Скотникова, А.М. Мороз // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2008. – №3. – С.16-19; 2). Gikalo, M.B. The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region / M.B. Gikalo, E.Y. Nosova, L.Y. Krylova, A.M. Moroz // J Antimicrob Chemother. – 2012. – V.67(9). – P. 2107-2109; 3). Nosova, E.Y. Analysis of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin / E.Y. Nosova, A.A. Bukatina, Y.D. Isaeva, M.V. Makarova, K.Y. Galkina, A.M. Moroz / J Med. Microbiol. – 2013. – V.62. – P.108-113; 4). Носова, Е.Ю. Сравнительная оценка эффективности молекулярных тест-систем «ТБ-БИОЧИП», «Xpert MTB/RIF» и «GenoType MTBDRplus» для быстрого определения мутаций, ответственных за лекарственную устойчивость *M.tuberculosis complex* в респираторном материале пациентов Московского региона / Е.Ю. Носова, М.А. Краснова, К.Ю. Галкина, М.В. Макарова, В.И. Литвинов, А.М. Мороз // Молекулярная

биология. – 2013. – Т.47, №1. – С.1-8; 5). Nosova, E.Y. A Comparison of the Sensititre MycoTB Plate, the Bactec MGIT 960, and a Microarray-Based Molecular Assay for the Detection of Drug Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Moscow, Russia / E.Y. Nosova, D.V. Zimenkov, A.A. Khakhalina, A.I. Isakova, L.Y. Krylova, M.V. Makarova, K.Y. Galkina, M.A. Krasnova, S.G. Safonova, V.I. Litvinov, D.A. Gryadunov, E.M. Bogorodskaya // PLoS ONE. – 2016. – №3. – P.1-14; 6). Jou, R. Redefining MDR-TB: Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Russia and Taiwan / R. Jou, W-T. Lee, E.V. Kulagina, J-Y. Weng, A.I. Isakova, W-H. Lin, O.V. Antonova, M-H. Wu, L.R. Arslanbaeva, H-Y. Tasi, E.Yu. Nosova, D.V. Zimenkov // Infection, Genetics and Evolution. – 2019. – V. 72. – P. 141-146.

На диссертацию и автореферат поступило 6 положительных отзывов без замечаний от: 1) д.м.н., профессора, член-корреспондента РАН Марьяндышева А.О., заведующего кафедрой фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава РФ; 2) д.б.н. Грядунова Д.А., главного научного сотрудника, заместителя директора по научной работе ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; 3) д.б.н., профессора Черноусовой Л.Н., главного научного сотрудника отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» Минобрнауки России ; 4) д.м.н., профессора Леви Д.Т., главного эксперта ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ; 5) д.б.н., Потапова В.Д., главного научного сотрудника отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; 6) к.б.н., Тетерина В.В., начальника научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны РФ и д.м.н., профессора Миронина А.В., ведущего научного сотрудника научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны РФ. В отзывах отмечено, что в ходе исследования получены новые данные о динамичном развитии лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам и инъекционным препаратам посредством последовательного накопления мутаций в генах *gyrA/gyrB* и в генах *rrs/eis*; новые данные о спектре и частоте встречаемости мутаций, детерминирующие разный уровень устойчивости возбудителя туберкулёза к основным антибактериальным препаратам первого и второго ряда; разработан алгоритм комплексной лабораторной диагностики качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза. В отзыве к.б.н. Тетерина В.В. и д.м.н., профессора Миронина А.В. отмечено, что текст автореферата изобилует многократно повторяющимися сокращениями, аббревиатурами, обозначениями генетических элементов, что затрудняет восприятие работы. В отзыве д.б.н. Грядунова Д.А. отмечено, что: употребляемый автором термин «дискордантные результаты» сложен как для чтения, так и для произношения на русском языке; термин «Генотип ЛЧ» вносит определенное недопонимание в смысл соответствующих глав работы, т.к. под генотипами МБТ подразумевают эпидемиологически значимые семейства Beijing, LAM, Ural и др., уместнее было бы употреблять термин мутационный профиль, характеризующий МЛУ, ШЛУ, полирезистентность и т.д.; логичным выводом соответствующих глав работы, могли бы стать диагностические характеристики созданных автором подходов для идентификации точечных мутаций на основе методик SSCP и ПДРФ при анализе образцов ДНК, выделенных непосредственно из клинического материала.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в вопросах изучения биологических свойств возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе *Mycobacterium tuberculosis*, резистентности микроорганизмов к

антибактериальным средствам и использование микробиологических методов для их характеристики.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана научная концепция современного представления о биологических свойствах резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, основанная на использовании современных молекулярно-генетических и бактериологических методах. Предложены модифицированные молекулярно-генетические методики для увеличения пула анализируемых мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*, ассоциированных с резистентностью *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам и инъекционным препаратам. Доказана связь различных вариантов мутаций с уровнем устойчивости микобактерии туберкулёза к наиболее эффективным препаратам основного (рифампицин, изониазид, этамбутол) и резервного ряда (фторхинолоны, аминогликозиды и капреомицин). Введены критерии качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам с использованием эффективных молекулярно-генетических и бактериологических методов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказана эффективность комплексного анализа устойчивых штаммов *M.tuberculosis*, включающего изучение новых механизмов формирования резистентности к антибактериальным препаратам, уровней устойчивости *M.tuberculosis* с новыми приобретенными генетическими свойствами, частоты и распространения мутаций в устойчивых штаммах, вносящая вклад в расширение представлений о биологических свойствах резистентных *M.tuberculosis*. Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс молекулярно-генетических и бактериологических методов исследования, позволивший повысить достоверность результатов определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам и сократить время получения результатов для назначения адекватной химиотерапии. Изложены данные о спектре и частоте встречаемости мутаций, ассоциированных с различным уровнем резистентности *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам, существенно дополнившие фенотипическую характеристику устойчивых *M.tuberculosis*. Изучены данные о различии в степени устойчивости *M.tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда, позволившие теоретически обосновать несоответствия в бактериологическом и молекулярно-генетическом определении лекарственной чувствительности. Раскрыта диагностическая эффективность молекулярных технологий отечественного и зарубежного производства и предложено оптимизированное их применение в разработанном алгоритме диагностики туберкулёза в клинической практике. Проведена модернизация микробиологической диагностики туберкулёза с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов, обеспечивающих качественную и количественную оценку лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза в клинической практике бактериологических лабораторий.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанный алгоритм внедрен в практическую деятельность Централизованной бактериологической лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы» (акт внедрения от 21.05.2021 г.). Разработаны методические рекомендации регионального уровня: «Определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биочипов» (№ 42 от 2008 г. - утверждены 29.09.2008 г.), «Алгоритм ускоренной микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулёза» (№ 53 от 2018 г. - утверждены 15.05.2018 г.). Определены перспективы практического использования

результатов исследования лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам с целью своевременного назначения адекватной химиотерапии или ее коррекции в процессе химиотерапии. В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы десять штаммов *M.tuberculosis* с различными типами генетических детерминант широкой лекарственной устойчивости, выделенные из биологического материала больных туберкулезом, в качестве контрольных штаммов для проведения фенотипических и молекулярно-генетических исследований устойчивости к антибактериальным препаратам (В-9360 - В-9369). Создана рабочая коллекция штаммов *M.tuberculosis*, выделенных из клинического материала больных туберкулезом, для дальнейшего изучения фенотипических и молекулярно-генетических механизмов устойчивости. Материалы диссертации вошли в курс лекций «Лабораторная диагностика туберкулеза», «Фтизиатрия», «Актуальные вопросы фтизиатрии», «Профилактика, диагностика и лечение туберкулеза» на кафедре фтизиатрии ФГБОУ дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России» (акт внедрения от 18.05.2021 г.) и в лекционный материал циклов профессиональной переподготовки по специальности «Фтизиатрия», «Пульмонология» и повышения квалификации «Диагностика и лечение туберкулеза с МЛУ МБТ» ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (акт внедрения от 26.05.2021 г.). Представлены предложения по дальнейшему усовершенствованию методологии выявления лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis* из гетерорезистентной популяции с использованием молекулярно-генетических и бактериологических методов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что объем выборки изученных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* и диагностического материала, полученного от пациентов, является достаточным, методы статистической обработки подобраны адекватно, исследования проведены на высоком научно-методическом уровне. В ходе выполнения диссертационной работы изучены 1516 клинических изолятов МБТ и 1551 проба респираторного материала (мокрота, бронхиальный секрет, бронхоальвеолярный лаваж) и материала, полученного после резекции лёгких (биоптат лёгочной ткани, содержимое каверн, туберкулом и эмпиемы), из которых выделено 3067 проб ДНК. Теория исследования построена на известных данных и согласуется с опубликованными экспериментальными данными, посвященными изучению развития приобретенной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*. Идея базируется на анализе теории и практики, обобщении экспериментальных отечественных и мировых данных в области микробиологии туберкулезной инфекции. Использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по проблеме идентификации и определению лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* с помощью молекулярно-генетических и бактериологических методов. Установлено, что большинство результатов исследования по изучению спектра и частоты распространения мутаций в устойчивых штаммах, а также их ассоциация с уровнями резистентности к основным антибактериальным препаратам основного и резервного ряда согласуются с данными научной литературы и дополняют их. Используются общепринятые и сертифицированные методы исследования, современные методы статистической и биоинформатической обработки результатов.

Личный вклад автора состоит в участии во всех этапах выполнения диссертационной работы. Автором, основываясь на анализе источников литературы, определена основная концепция научного исследования и его дизайн, конкретизированы цель и задачи, выбраны оптимальные методики исследования, разработан алгоритм лабораторной диагностики, проведены анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка полученных данных, оформлены патенты и подготовлены методические рекомендации.

Бактериологические исследования выполнены в ЦБЛ ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом» ДЗМ» и интерпретированы совместно с научными сотрудниками отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом» ДЗМ» д.б.н М.В. Макаровой, к.б.н Ю.Д. Михайловой, к.б.н Л.Ю. Крыловой. Клинические штаммы *M.tuberculosis* секвенировали в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН совместно с научными сотрудниками Зименковым Д.В и Грядуновым Д.А. Полученные данные обобщены в основных публикациях и докладах на научно-практических конференциях.

На заседании 11 ноября 2021 года диссертационный совет принял решение присудить Носовой Елене Юрьевне ученую степень доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 12 докторов наук по специальности 1.5.11. – микробиология, участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за –14, против – 2, недействительных бюллетеней –1.

Председатель диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Алёшкин Владимир Андрианович

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

12.11.2021