

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрат Радиковича 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

Наблюдающиеся тенденции по заболеваемости туберкулёзом и их связь с кардинальными изменениями устойчивости возбудителя, в настоящее время является одной из наиболее актуальных междисциплинарных проблем фтизиатрии и целого ряда смежных дисциплин, поскольку эффективная диагностика лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам является наиважнейшим условием эффективной химиотерапии и её своевременной коррекции. От её успешности во многом зависит динамика эпидемического процесса и отдалённые социально-экономические последствия распространения и селекции лекарственной устойчивости в популяции возбудителя.

Вместе с тем в последние годы несмотря на широкое применение на практике целого ряда новых микробиологических технологий, включая молекулярно-генетические, существенно возросла критическая масса вопросов, обусловленных, в частности, низкими уровнями коррелятивных связей между результатами классических микробиологических техник, опирающихся преимущественно на анализ фенотипических признаков и данными, получаемыми при использовании молекулярно-генетических методов. Обозначенные научно-практические проблемы крайне актуализировали необходимость глубоко системного анализа сложившейся ситуации, в основе которой могут находиться как новые неизвестные ранее изменения фармакогеномики одного из наиболее консервативных геномов, к которым относят геном *M.tuberculosis*, так и процессы, эволюционно происходящие на уровне протеомики и метаболомики этих микроорганизмов.

В связи с этим обозначенная в работе Носовой Елены Юрьевны научная проблема системного анализа генотипических и фенотипических данных при заболеваниях, вызываемых *M.tuberculosis*, для их последующей гармонизации представляется исключительно актуальной.

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

Автором получены новые данные об определяющей роли ряда мутаций, их спектре и частоте встречаемости в ключевых генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, детерминирующих устойчивость *M.tuberculosis* к основным препаратам резервного ряда.

Автором на платформе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ разработана охраноспособная методология анализа генов *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, которая позволила существенно повысить производительность лабораторной диагностики устойчивости *M.tuberculosis* к препаратам резервного ряда (Патенты на изобретение РФ - № 2343197 от 10.01.2009, № 2439162 от 10.01.2012, 2409680 от 20.01.2011, № 2509158 от 10.03. 2014).

Впервые показана возможность определения ряда мутаций и их сочетаний в генах *gyrA/gyrB*, позволяющая дифференцировать устойчивость к офлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину по степени силы признака: высокая, умеренная, низкая и «промежуточная».

Установлены варианты устойчивости штаммов *M.tuberculosis* в зависимости от способа их введения (инъекционный) - с мутациями в *rrs* (умеренная и высокая к канамицину и амикацину, умеренная и низкая к капреомицину) и *eis* (низкая и «промежуточная» к канамицину и «промежуточная» к амикацину).

Показано значительное разнообразие генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, представленное 30 вариантами мутаций в 6 кодонах (511, 513, 516, 533, 526, 531) гена *rpoB*. Установлены различия в степени устойчивости штаммов к препарату: в преобладающем

большинстве (89,9% изолятов) высокая и умеренная ассоциирована с заменой S531L (79,7%) и мутациями в 526 кодоне и «промежуточная» с шестью типами (D516Y, D516G, H526N, H526C, L533P, L511P) и тремя двойными (L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L). По результатам исследования различия в степени устойчивости *M.tuberculosis* к изониазиду и этамбутолу не установлены.

Получено свидетельство того, что 97% изолятов с мутациями в генах *katG*, *ahpC* и *inhA* к изониазиду, проявляют высокую или умеренную степень фенотипической устойчивости, тогда как 88% изолятов с мутациями в *embB* экспрессируют устойчивость к этамбутолу «промежуточной» силы.

Установлена высокая частота среди МЛУ штаммов с мутациями S531L в *rpoB* и S315T в *katG*, ассоциированная с умеренной и высокой степенью устойчивости к рифампицину и изониазиду.

По результатам обследования 2657 пациентов с различными формами туберкулёза и подозрением на заболевание автором обоснована 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.

Сформулированные автором положения, выводы и практические рекомендации обоснованы и вытекают из результатов проведённых исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы

Автор в процессе исследования устойчивых штаммов микробиологическими методами существенно расширил границы представлений о биологических свойствах *M.tuberculosis*, сопряженных с

различиями в степени устойчивости возбудителя к химиотерапевтическим препаратам, ассоциированными с конкретными мутациями, вариантами их сочетаний и частотой встречаемости, что позволило дополнить видение механизмов формирования резистентности *M.tuberculosis*.

Это в известной степени расширило современные представления о фенотипических вариантах различных форм и механизмов устойчивости микобактерий, а также степень влияния различных вариантов мутаций и их сочетания на уровень устойчивости *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Указанное имеет большое научно-практическое значение для лабораторной диагностики, поскольку способствует обоснованному пониманию получаемых в ряде случаев дискордантных результатов бактериологического и молекулярно-генетического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам.

Автором разработана методология, расширяющая спектр детектируемых клинически значимых мутаций в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis* и повысить результативность выявления устойчивых *M.tuberculosis* к фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину.

На основе полученных данных об ассоциированности ряда мутаций с уровнем устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам обосновано применение количественного бактериологического определения лекарственной чувствительности возбудителя, позволяющего адекватно характеризовать устойчивость возбудителя по сравнению с результатами в Bactec MGIT 960.

Практическую значимость имеет оптимизированная схема генодиагностики для исследования операционного материала, у больных туберкулёзом для назначения химиотерапии в послеоперационный период.

Разработанный автором алгоритм комплексной лабораторной диагностики качественной и количественной оценки лекарственной

устойчивости возбудителя туберкулёза, с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов позволяет своевременно получать объективную информацию для выбора адекватной схемы химиотерапии.

Достоверность и апробация результатов исследования.

Достоверность полученных результатов обеспечена достаточным объемом исследований, применением комплекса современных молекулярно-генетических и бактериологических методов, использованием современного сертифицированного оборудования. Анализ данных молекулярно-генетических исследований проводился с использованием сертифицированного программного обеспечения и международных биоинформатических веб-платформ. Полученные результаты исследования обработаны с помощью современных статистических методов.

Результаты диссертационного исследования были представлены в виде докладов и обсуждались 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 в коллективной монографии. Автором получены 4 патента на изобретение РФ. Методические разработки по лабораторной диагностике туберкулёза положены в основы методических рекомендаций регионального уровня, утверждённых Департамента здравоохранения города Москвы «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.)

Оценка содержания, завершённости и оформление диссертации

Диссертационная работа Носовой Елены Юрьевны. изложена традиционно на 311 страницах машинописного текста и содержит разделы введение, обзор литературы, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы. Работа иллюстрирована 58 таблицами и 14 рисунками. Список литературы включает 366 работ, из них 39 отечественных и 327 зарубежных источников. Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объеме представлены в автореферате и полностью соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата полностью отвечает существующим требованиям.

Таким образом, диссертационная работа Носовой Елены Юрьевны является завершенным научным исследованием, обладающим научной новизной, теоретической и практической значимостью.

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».

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Замечаний, которые могли бы снизить научную ценность диссертационной работы нет.

Вопросы к автору:

1. Каковы, на Ваш взгляд, ближайшие тенденции изменений лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* и почему?
2. Имеются ли данные, характеризующие лекарственную устойчивость нетуберкулезных микобактерий и как эти процессы соотносятся с тенденциями, выявленными у *Mycobacterium tuberculosis*?
3. Охарактеризуйте в сравнении основные преимущества и ограничения использованных Вами в работе методов ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ, предопределивших их использование.
4. Каковы, на Ваш взгляд, в сравнении основные преимущества и ограничения амплификационных и ДНК-ДНК гибридизационных молекулярно-генетических технологий, использованных в Вашей работе?

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 на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы изучения генотипических и фенотипических свойств устойчивых микобактерий туберкулёза, совершенствование микробиологической диагностики на основе разработанного алгоритма качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза с помощью 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

Заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Башкирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

Адрес: 450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3;

тел.: 8 (347) 272-41-73

e-mail: ufalab@mail.ru

доктор медицинских наук, профессор

Мавзютов Айрат Радикович

