

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Носовой Елены Юрьевны на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология

### **Актуальность темы исследования**

Наращение лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* (МВТ) к антибактериальным препаратам (АБП) и повсеместное распространение устойчивых штаммов в мире, в том числе в большинстве регионов РФ, является одной из главных проблем, осложняющих борьбу с туберкулёзом (ТБ). Тяжесть заболевания ТБ значительно увеличивается, прежде всего, при множественной (МНУ) и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) возбудителя и требует более длительного лечения препаратами, которые намного дороже, имеют ограниченную эффективность и большое количество побочных эффектов.

Для предотвращения распространения лекарственно-устойчивых микобактерий туберкулёза является важным своевременное максимально быстрое выявление возбудителя заболевания и определение профиля его лекарственной чувствительности к антибактериальным препаратам.

Современная лабораторная диагностика ТБ основана на использовании ускоренных микробиологических методов. Однако, несмотря на их широкое применение в микробиологических лабораториях фтизиатрического профиля надёжность получаемых результатов не всегда соответствует приемлемому уровню. Существуют проблемы оценки чувствительности МВТ к антибиотикам. А в отношении основных препаратов второго ряда (фторхинолонов и инъекционных препаратов) единых стандартов и готовых зарегистрированных (сертифицированных) наборов до сих пор нет, а разрабатываемые «критические концентрации» (КК) носят рекомендательный характер. В последние годы также изменились представления о критериях оценки лекарственной чувствительности МВТ к АБП по установленным КК,

приводящие, в некоторых случаях, к расхождению результатов между различными микробиологическими методами.

Вышесказанное определяет необходимость разработки молекулярно-генетических методик, позволяющих анализировать расширенный спектр мутаций и генов для повышения достоверности получаемых результатов устойчивости МВТ к основным препаратам резервного ряда. Актуальным остаётся оптимизация генодиагностики лекарственной чувствительности МВТ к основным препаратам первого и второго ряда за счёт адаптации и внедрения наиболее эффективных тест-систем, бактериологической диагностики для оценки уровня устойчивости МВТ к АБП и необходимость разработки алгоритма ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза с применением современных бактериологических методов и молекулярно-генетических технологий для адекватного определения лекарственной чувствительности.

#### **Цель исследования**

Целью исследования является разработка алгоритма качественного и количественного определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к основным и резервным препаратам с использованием модифицированных методик, современных молекулярно-генетических и бактериологических технологий и изучение спектр генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*.

#### **Апробация результатов исследования**

Диссертационная работа апробирована на заседании Учёного совета ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом ДЗМ».

Материалы диссертации были доложены на 14 конгрессе Европейского респираторного общества в 2004 г.; VI Московской ассамблее «Здоровье столицы», Москва, 2007 г.; Конгрессе европейского респираторного общества, 2010г.); X Московской ассамблее «Здоровье столицы», Москва, 2011;

V научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ», Москва 2012; V ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 2013; V Ежегодной конференции московских фтизиатров «Профилактическая противотуберкулёзная работа в мегаполисе: объем, затраты, эффективность», Москва, 2017; Конгрессе европейского респираторного общества, 2017); международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018», Минск 2018; XI съезде фтизиатров России, Владикавказ, 2019.

По теме диссертации опубликовано 41 печатная работа, из них 21 статья в рецензируемых изданиях, 7 статей – 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.

#### **Общее содержание автореферата**

В ходе проведенных исследований использовались микробиологические, эпидемиологические, молекулярно-генетические, методы и методы статистического анализа. Экспериментальные исследования выполнены автором лично или в соавторстве. Автореферат диссертации изложен на 45 страницах компьютерного текста, имеет традиционную структуру – состоит из шести разделов (общая характеристика работы, основное содержание работы, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список работ, опубликованных по теме диссертации), а также включает 5 рисунков, 8 таблиц, список из 41 работы, опубликованных по теме диссертации. Содержание автореферата, в целом, соответствует основным положениям, выносимым на защиту, и выводам диссертации.

Обложка реферата оформлена правильно.

### Новизна исследований и полученных результатов, выводов и рекомендаций

Впервые по результатам исследования установлена определяющая роль генетических детерминант устойчивости в генах *gyrA/gyrB* к фторхинолонам – офлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину (патенты на изобретения РФ № 2343197 от 10.01.2009, № 2439162 от 10.01.2012) и в генах *rrs/eis* к инъекционным препаратам - канамицину, амикацину и капреомицину (патенты на изобретения РФ № 2409680 от 20.01.2011, № 2509158 от 10.03. 2014).

Получены новые данные о спектре и частоте встречаемости мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*. Впервые определены одиночные и двойные замены в *gyrA* или *gyrA/gyrB*, приводящие к умеренной и высокой степени устойчивости к офлоксацину, левофлоксацину и моксифлоксацину.

Показано, что устойчивость к инъекционным препаратам (канамицину, амикацину и капреомицину) связана с мутациями в гене *rrs*, а замены в промоторной области гена *eis* с устойчивостью только к канамицину. Выявлены различия в степени устойчивости штаммов *Mycobacterium tuberculosis* 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).

Определено большое разнообразие генетических детерминант устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину, представленное 30 вариантами мутаций в 6 кодонах (511, 513, 516, 533, 526, 531) гена *rpoB*. Показано, что высокая и умеренная степень устойчивости к препарату в 89,9% изолятов ассоциирована с заменой S531L (79,7% изолятов) и мутациями в 526 кодоне. Впервые выявлена связь шести типов мутаций с «промежуточной» степенью устойчивости к препарату.

Впервые определено, что преобладающее большинство штаммов (88%) с различными типами мутаций в гене *embB* проявляют «промежуточную» устойчивость к этамбутолу.

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

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

Необходимо отметить высокую теоретическую и практическую значимость работы, заключающуюся в том, что научно подкреплён выбор генетических мишеней для выявления детерминант устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам резервного ряда в целях создания молекулярно-генетических методик, что делает возможным получать новые сведения о механизмах развития приобретённой лекарственной устойчивости; получены новые данные об уровне устойчивости возбудителя туберкулёза, заключающиеся в установлении спектра и частоты встречаемости мутаций, ассоциированных с высоким, низким и «промежуточным» уровнем резистентности к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам, существенно дополняют фенотипическую характеристику устойчивых *Mycobacterium tuberculosis*; экспериментально выявленные различия в степени устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда позволили теоретически обосновать несоответствия в бактериологическом и молекулярно-генетическом определении лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам; данные молекулярного изучения устойчивых штаммов *Mycobacterium 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; обоснована диагностическая эффективность молекулярных технологий при исследовании операционного материала у больных без бактериовыделения для адекватного назначения химиотерапии в послеоперационный период; десять штаммов *Mycobacterium tuberculosis* различными типами генетических детерминант широкой лекарственной устойчивости, выделенные из биологического материала больных туберкулёзом, депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» как контрольные штаммы для проведения фенотипических и молекулярно-генетических исследований устойчивости к антибактериальным препаратам (В-9360 - В-9369); разработанный алгоритм ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза изложен в методических рекомендациях Департамента здравоохранения города Москвы «Алгоритм ускоренной микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулёза» (№ 53 от 2018 г. - утверждены 15.05.2018 г.); результаты исследования и разработанный алгоритм микробиологической диагностики туберкулёза внедрены в практической деятельности 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.); материалы диссертации вошли в курс лекций на кафедре фтизиатрии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России» (акт внедрения от 18.05.2021 г.) и Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-

### **Недостатки**

Текст автореферата изобилует многократно встречающимися сокращениями, аббревиатурами, обозначениями генетических элементов и т.д., что затрудняет восприятие содержания работы. На страницах 3, 4, 8, 34 имеются пунктуационные ошибки. Однако отмеченные недостатки не снижают научной ценности и практической значимости работы.

### **Заключение**

В автореферате диссертационной работы Елены Юрьевны Носовой на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология, изложены основные идеи и выводы диссертации, показан вклад автора в проведенные исследования, сформулированы степень новизны и практической значимости приведенных результатов исследований, содержатся сведения об организации, о научных консультантах, приводится список публикаций автора диссертации, в которых отражены основные научные результаты диссертации.

Автореферат диссертационной работы Елены Юрьевны Носовой на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология, соответствует требованиям пункта 25 «Положения о присуждении научных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года (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, № 751 от 26.05.2020, № 426 от 20.03.2021 «О внесении

изменений в Положение о присуждении учёных степеней»), а диссертация, судя по изложенному в автореферате материалу, соответствует требованиям п. 9 данного «Постановления...», предъявляемым к докторским диссертациям, и её автор достойна присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология.

Начальник научно-исследовательского отдела  
филиала федерального государственного бюджетного учреждения  
«48 Центральный научно-исследовательский институт»  
Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров);  
610000, город Киров, Октябрьский проспект, дом 119;  
телефон (8332) 641813  
кандидат биологических наук

 Владимир Валентинович Тетерин

Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела  
филиала федерального государственного бюджетного учреждения  
«48 Центральный научно-исследовательский институт»  
Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров);  
610000, город Киров, Октябрьский проспект, дом 119;  
телефон (8332) 641813  
доктор медицинских наук,  
профессор

 Александр Викторович Миронин

Подписи начальника научно-исследовательского отдела, кандидата биологических наук Владимира Валентиновича Тетерина и ведущего научного сотрудника научно-исследовательского отдела, доктора медицинских наук, профессора Александра Викторовича Миронина заверяю:

Ученый секретарь научно-технического совета  
филиала федерального государственного бюджетного учреждения  
«48 Центральный научно-исследовательский институт»  
Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров);  
610000, город Киров, Октябрьский проспект, дом 119;  
телефон (8332) 641813  
кандидат медицинских наук



Алексей Владимирович Филиппов

«19» октября 2021 г.