



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»**
(ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова)

Российская Федерация
105064, г. Москва
М. Казетный пер., 5А

Телефон/факс: (495) 917-49-00
Телефон/факс: (495) 917-54-60
E-mail: mech.inst@mail.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ НИИВС
им. И.И. Мечникова

д.м.н., член-корреспондент РАН

О.А. Свитич

« 12 » октября 2021 года

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» о научно-практической значимости диссертационной работы Носовой Елены Юрьевны на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология

Актуальность темы исследования

Проблема роста заболеваемости туберкулёзом с лекарственной устойчивостью возбудителя, особенно с множественной и широкой резистентностью к высокоэффективным препаратам, на протяжении нескольких лет рассматривается как глобальная угроза безопасности в области здравоохранения во всём мире. Российская Федерация по-прежнему входит в число стран с высоким «бременем» туберкулёза с МЛУ, которое обусловлено высокой заболеваемостью как у впервые выявленных, так и ранее леченых

больных и приводит к снижению эффективности лечения, росту смертности, ухудшению эпидемической ситуации.

В сложившихся условиях изучение формирования лекарственной резистентности, а именно молекулярных механизмов, обеспечивающих устойчивость мутантных штаммов *M.tuberculosis* к лекарственному воздействию, является приоритетным направлением в микробиологической диагностике туберкулёза. К настоящему времени остаются не исследованными механизмы адаптации возбудителя к основным препаратам второй линии (фторхинолонам, инъекционным препаратам) за счёт появления новых мутаций в известных генах-мишенях или в новых. Не исследованы должным образом уровни устойчивости мутантных штаммов с новыми приобретёнными генетическими свойствами; не определены варианты генетических детерминант резистентности ко всей группе фторхинолонов и инъекционных препаратов, их спектр и частота встречаемости в изолятах с резистентностью различного уровня к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам.

Отсутствие достоверной и объективной оценки лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам объясняется недостаточной эффективностью существующих молекулярно-генетических тестов и критериев её оценки бактериологическими методами. Это обусловило характер исследования направленный на совершенствование микробиологической диагностики туберкулёза, включая оптимизацию генодиагностики и бактериологических методов для адекватного определения лекарственной чувствительности.

Учитывая вышесказанное, диссертационная работа Носовой Елены Юрьевны, посвящённая изучению генотипической и фенотипической устойчивости *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам, совершенствованию микробиологической диагностики туберкулёза, является актуальной и представляет значительный научный и практический интерес. Результаты работы имеют важное значение для адекватного назначения

химиотерапии больным туберкулёзом, а также мониторинга устойчивости возбудителя в выявляемых очагах туберкулёзной инфекции.

Новизна, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационного исследования не вызывает сомнений. Впервые по результатам исследования установлена определяющая роль генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам в двух генах *gyrA* и *gyrB* (офлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину) и в генах *rrs* и *eis* к инъекционным препаратам (канамицину, амикацину и капреомицину). Автором разработаны модифицированные молекулярно-генетические методики на основе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ ДНК *M.tuberculosis*, позволяющие увеличить пул анализируемых мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis* (патенты на изобретения РФ № 2343197 от 10.01.2009, № 2439162 от 10.01.2012, 2409680 от 20.01.2011, № 2509158 от 10.03. 2014).

Получены новые данные о спектре и частоте встречаемости мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*, приводящие к различному уровню устойчивости к фторхинолонам. Показано, что замены A90V и D94A в *gyrA* обуславливают низкую степень устойчивости *M.tuberculosis* к офлоксацину и «промежуточную» к моксифлоксацину; редко встречающиеся в *gyrA* (G88A, D94V, A74S и G88A/H70A/G509A) и замены в *gyrB* (N538K, D500H, D500N, N538D, T539N) - «промежуточную» степень устойчивости к офлоксацину и моксифлоксацину. Выявлены различия в степени устойчивости штаммов *M.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). 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. Установлено, что в 89,9% изолятов высокая и умеренная степень устойчивости к рифампицину ассоциирована с заменой S531L (79,7% изолятов) и мутациями в 526 кодоне. Впервые определены шесть типов мутаций и три двойные (D516Y, D516G,

H526N, H526C, L533P, L511P, L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L) ассоциированные с «промежуточной» степенью устойчивости к препарату. Высокий и умеренный уровень устойчивости к изониазиду в 97% изолятов связан с мутациями в гене *katG* (S315T, I335V, S315N) или в сочетании с *inhA*, *ahpC*, а также заменой с(-15)t в промоторной части гена *inhA*. Установлена высокая частота обнаружения МЛУ штаммов с умеренной и высокой степенью устойчивости, опосредованная мутациями S531L в *rpoB* и S315T в *katG*. Впервые показано, что в 88% штаммов с различными типами мутаций в гене *embB* проявляют «промежуточную» устойчивость к этамбутолу.

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

Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, обоснованы и соответствуют результатам проведённых исследований.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Носовой Е.Ю. выполнена в соответствии с тематикой и планом научно-исследовательской работы Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» в рамках комплексных тем научно-исследовательских работ научных программ Департамента здравоохранения города Москвы: «Совершенствование методов идентификации возбудителя туберкулёза и микобактериозов и эффективности химиотерапии» (2014-2016 гг., номер государственной регистрации 01201457859); «Новые подходы к дифференциальной диагностике туберкулёза и определения лекарственной

чувствительности микобактерии туберкулёза и нетуберкулёзных микобактерий к антибактериальным препаратам у больных туберкулезом, в том числе с ВИЧ-инфекцией» (2017-2019 гг., номер государственной регистрации АААА-А17-117060510016-6).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Теоретическая значимость работы состоит в том, что на основании многолетнего исследования с использованием комплекса молекулярно-генетических и бактериологических методов существенно дополнена характеристика биологических свойств *M.tuberculosis*, включая новые сведения о механизмах развития приобретённой лекарственной устойчивости, различия в уровне устойчивости *M.tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда и их ассоциации с установленным спектром и частотой встречаемости мутаций. Полученные данные имеют важное значение для клинической микробиологии, позволяющие обосновать несоответствия в результатах молекулярно-генетического и бактериологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам.

Работа имеет несомненно большую практическую значимость. Разработаны молекулярно-генетические методики для выявления расширенного спектра генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину, позволяющие увеличить точность получаемых результатов. Получены сведения об ассоциации мутаций с уровнем резистентности *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам, которые более точно характеризуют устойчивость возбудителя по сравнению с результатами в Bactec MGIT 960. Обосновано тестирование лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к моксифлоксацину при «критической концентрации» 0,25 мкг/мл в Bactec MGIT 960, позволяющее увеличить корреляцию с молекулярно-генетическим определением чувствительности к препарату и получать адекватные результаты исследования. Автором доказана диагностическая эффективность молекулярных технологий при исследовании операционного

материала у больных без бактериовыделения, что позволило проводить адекватную химиотерапию в послеоперационный период.

Разработаны алгоритм и рекомендации о целесообразности комплексной лабораторной диагностики качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов.

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 туберкулёзом, как контрольные штаммы для проведения фенотипических и молекулярно-генетических исследований устойчивости к антибактериальным препаратам (В-9360 - В-9369).

Сформирована рабочая коллекция штаммов *M.tuberculosis*, выделенных из клинического материала больных туберкулёзом, которая может быть использована для изучения фенотипических и молекулярно-генетических механизмов устойчивости.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность полученных результатов работы не вызывает сомнений и подтверждается большим объёмом исследований достаточным для корректной статистической обработки данных. Для решения поставленных задач был использован комплекс современных молекулярно-генетических и бактериологических методов, отличающихся высокой воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью. Проведённые исследования с использованием современного сертифицированного оборудования с программным обеспечением для биоинформационного и статистического анализа, позволяют считать результаты исследования достоверными.

Основные результаты диссертационного исследования и его научно-практическое значение достаточно полно отражены в опубликованных 41

печатной работе, в том числе в 21 статье в рецензируемых изданиях, 1 в коллективной монографии, 4 патентах на изобретение РФ, свидетельствах о депонировании штаммов в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур. Материалы исследований представлены в виде докладов на 10 международных, всероссийских и региональных конференциях.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Предложенные научно обоснованные подходы к проведению комплексной молекулярно-генетической и бактериологической диагностики лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам могут быть рекомендованы для активного внедрения в практику микробиологических лабораторий фтизиатрического профиля.

Депонированные штаммы *M.tuberculosis* с различными вариантами генетических детерминант широкой лекарственной устойчивости могут быть использованы в качестве контрольных тест-штаммов при проведении фенотипических и молекулярно-генетических исследований в научных учреждениях и микробиологических лабораторий фтизиатрического профиля.

Разработанный алгоритм микробиологической диагностики туберкулёза внедрены 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.).

Материалы диссертации вошли в курс лекций «Лабораторная диагностика туберкулёза», «Фтизиатрия», «Актуальные вопросы фтизиатрии», «Профилактика, диагностика и лечение туберкулёза» 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.); в лекционный материал циклов

профессиональной переподготовки по специальности «Фтизиатрия», «Пульмонология» и повышения квалификации «Диагностика, диагностика, лечение туберкулёза с МЛУ МБТ» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» (акт внедрения от 26.05.2021 г.).

Оценка содержания и оформление диссертации

Диссертация выполнена по специальности 1.5.11. – микробиология. Построена по традиционной форме. Структура работы соответствует ГОСТ Р 7.0 11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Диссертация изложена на 311 страницах машинописного текста, написана грамотным научным языком и содержит разделы введение (включающий методологию и методы исследования), обзор литературы, 3 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы. Работа иллюстрирована 58 таблицами и 14 рисунками. Библиографический список включает 366 литературных источников, из которых 39 отечественных и 327 зарубежных.

Автореферат в полной мере отражает краткое содержание диссертационной работы.

Заключение

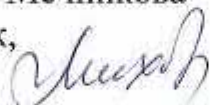
Таким образом, диссертационная работа Елены Юрьевны Носовой на тему «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики», является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований, а 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.

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.

Отзыв на диссертацию Носовой Елены Юрьевны рассмотрен и утверждён на конференции отдела микробиологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова 23 сентября 2021 г., протокол № 3/2021.


Руководитель научного направления по иммунобиотехнологии,
заведующий отделом микробиологии
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова
Доктор медицинских наук,
профессор



Михайлова Наталья Александровна

Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а
тел.: 8 (495) 917-49-00, e-mail: mch.inst@mail.ru

Подпись Натальи Александровны Михайловой заверяю
Заместитель директора ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова»
канд. мед наук



О.В. Артемьева