

«Утверждаю»

Директор

ГБУЗ «МНИИЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»

Е.М. Богородская

2021 г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

Диссертация «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики» выполнена в отделе проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии.

В период подготовки диссертации соискатель Носова Елена Юрьевна работала в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» в отделе проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии в должности ведущего научного сотрудника.

В 1991 году окончила 2ой Московский ордена Ленина государственный медицинский институт им. Н.И. Пирогова по специальности «Биофизика» квалификация «Врач-биофизик». В 2002 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Молекулярно-генетическое определение *Mycobacterium tuberculosis* у больных различными формами туберкулёза» по специальности микробиология (03.00.07) в Диссертационном совете Д 208.046.01 при Московском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского.

Научный консультант:

Литвинов Виталий Ильич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», научный руководитель.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертация Носовой Е.Ю является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема по совершенствованию лабораторной диагностики туберкулеза за счет разработки новых методологических подходов в определении лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёза к антибактериальным препаратам, имеющая важное значение для развития специализированных разделов микробиологии и для внедрения во фтизиатрическую практику.

Актуальность выбранной темы исследования определяется продолжающимся нарастанием лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам и повсеместным распространением устойчивых штаммов, осложняющие борьбу с туберкулёзом. Туберкулёз с множественной и не редко уже с широкой лекарственной устойчивостью, все чаще выявляется не только у лиц с хроническим течением процесса, но и у впервые выявленных пациентов. Существенную напряжённость в эпидемическую ситуацию вносят мигранты и больные с сочетанной инфекцией ВИЧ-туберкулёз. В связи с этим для предотвращения распространения лекарственно-устойчивых микобактерий туберкулёза чрезвычайно важным является максимально быстрое выявление возбудителя заболевания и определение профиля его лекарственной чувствительности к АБП. Вместе с тем, развитие лекарственной устойчивости МБТ к АБП характеризуется появлением новых мутаций в известных генах-мишенях или в новых бактериальных генах, что определяет необходимость разработки новых

молекулярно-генетических тестов. В свою очередь, определение лекарственной чувствительности МБТ к ПТП с помощью установленной «критической концентрации» к каждому препарату на разных средах нередко приводит к расхождению результатов и не позволяет в полной мере охарактеризовать уровень устойчивости возбудителя, который важно знать при выборе препаратов, позволяющих преодолеть «низкую» устойчивость микобактерий туберкулёза. Таким образом, очевидна актуальность диссертационной работы Носовой Е.Ю., направленной на необходимость совершенствования методических подходов с применением молекулярно-генетических и бактериологических методов для более точного определения лекарственной чувствительности.

Диссертационная работа Носовой Е.Ю. выполнена в соответствии с тематикой и планом научно-исследовательской работы ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗМ» в рамках комплексных тем научно-исследовательских работ: «Совершенствование методов идентификации возбудителя туберкулёза и микобактериозов и эффективности химиотерапии» (тема включена в научную программу Департамента здравоохранения города Москвы на 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» (включена в программу Департамента здравоохранения города Москвы, на 2017-2019 гг., регистрационный номер АААА-А17-117060510016-6). Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ (протокол № 10) 26 октября 2017 г.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в определении основной концепции научного исследования и его дизайна, разработке плана исследования, формулировке

цели и задач, выбора предмета, методологии и методов исследования, разработке алгоритма лабораторной диагностики, анализе и интерпретации результатов, статистической обработке полученных данных, написании основных публикаций, методических рекомендаций, диссертации и автореферата, оформлении патентов.

Автор участвовал во всех этапах молекулярно-генетических исследований по определению генетических детерминант устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам первого и второго ряда. Бактериологические исследования выполнены и интерпретированы совместно с научными сотрудниками д.б.н Макаровой М.В., к.б.н Михайловой (Исаевой) Ю.Д., к.б.н Крыловой Л.Ю в Централизованной бактериологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом ДЗМ». Секвенирование штаммов *Mycobacterium tuberculosis* и анализ данных проводился на базе Института молекулярной биологии им. В.А Энгельгардта РАН совместно с сотрудниками Зименковым Д.В и Грядиновым Д.А.

Использование адекватных методов и методологических подходов для решения поставленных задач, объем проведённых исследований, достаточный для корректной статистической обработки данных, позволяют считать результаты исследований достоверными и не вызывающими сомнений. Сделанные автором выводы и рекомендации аргументированы и вытекают из результатов проведённых исследований.

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые по результатам исследования установлена определяющая роль генетических детерминант устойчивости в генах *gyrA/gyrB* к фторхинолонам - офлоксацину, левофлоксацину, моксифлоксацину и в генах *rrs/eis* к инъекционным препаратам - канамицину, амикацину и капреомицину.

Разработаны модифицированные молекулярно-генетические методики на основе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ ДНК *M.tuberculosis* для увеличения пула анализируемых мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*.

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 большинство штаммов с заменами A90V и D94A в *gyrA* проявляют низкую степень устойчивости к Ofx и «промежуточную» к Mfx. Выявлены редко встречающиеся в *gyrA* (G88A, D94V, A74S и G88A/H70A/G509A) и замены в *gyrB* (N538K, D500H, D500N, N538D, T539N), которые обуславливают «промежуточную» степень устойчивости *M.tuberculosis* к офлоксацину 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 *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).

Определено большое разнообразие генетических детерминант устойчивости *M.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 и трёх двойных (D516Y, D516G, H526N, H526C, L533P, L511P, L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L) с «промежуточной» степенью устойчивости к препарату.

Показано, что генетические детерминанты устойчивости к изониазиду, представленные мутациями в гене *katG* (S315T, I335V, S315N) или в сочетании с *inhA*, *ahpC*, а также заменой с(-15)t в промоторной части гена *inhA*, в 97% изолятов приводят к высокой/умеренной степени устойчивости. Установлена высокая частота обнаружения штаммов с умеренной и высокой степенью

устойчивости к рифампицину и изониазиду (штаммы с множественной лекарственной устойчивостью) опосредованная мутациями S531L в *rpoB* и S315T в *katG*.

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).

Научная новизна подтверждена четырьмя патентами на изобретение (разработка молекулярно-генетических методик).

Практическая значимость исследования состоит в разработке алгоритма комплексной лабораторной диагностики качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов, повышающих достоверность результатов определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам и сокращающих время получения результатов для назначения адекватной химиотерапии.

С использованием разработанных молекулярно-генетических методик и секвенирования установлены клинически значимые типы мутаций и их сочетания в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, приводящие к развитию устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам резервного ряда. Применение разработанных методик позволит увеличить спектр анализируемых мутаций и повысить надёжность получаемых результатов выявления генетических детерминант устойчивости *M.tuberculosis* к фторхинолонам, аминогликозидам

и капреомицину. Тестирование лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к моксифлоксацину при «критической концентрации» 0,25 мкг/мл в Bactec MGIT 960 позволяет увеличить корреляцию с молекулярно-генетическим определением чувствительности к препарату и получать адекватные результаты исследования.

Полученные данные ассоциации мутаций с уровнем устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам более точно характеризуют устойчивость возбудителя по сравнению с результатами в Bactec MGIT 960 и дают возможность фтизиатрам своевременно внести коррективы в схему химиотерапии больных туберкулёзом. Обоснована диагностическая эффективность молекулярных технологий при исследовании операционного материала у больных без бактериовыделения для адекватного назначения химиотерапии в послеоперационный период.

Десять штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с 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).

Ценность научной работы соискателя состоит в получении новых данных 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 дополняющих фенотипическую характеристику устойчивых *M.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 *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам. 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

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям и выводам диссертационная работа соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.11. – микробиология (медицинские науки) и области исследования: пункты 2 «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов», 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и 4 «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

Разработанные в диссертации подходы к ускоренной лабораторной диагностики туберкулёза во фтизиатрической практике, включающие проведение комплексных диагностических исследований с использованием бактериологических методов и наиболее эффективные молекулярно-генетические тест-системы апробированы, внедрены и используются в работе Централизованной бактериологической лаборатории, Городского клинико-диагностического центра, терапевтических и хирургических отделений ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ». 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» и Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза».



Основное содержание диссертации отражено в 41 опубликованной работе, в том числе 21 статье в рецензируемых научных изданиях. Опубликованные работы отвечают тематике диссертационного исследования и полностью раскрывают его содержание.

Наиболее значительные научные работы по теме диссертации:

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. **Носова, Е.Ю.** Молекулярно-генетические исследования во фтизиатрии / **Е.Ю. Носова**, М.А. Краснова, К.Ю. Галкина, А.А. Букатина, Ю.Д. Исаева // Туберкулез и болезни лёгких. – 2011. – № 6. – С. 28-32.
3. 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.
4. Литвинов, В.И. Биочипы в диагностике туберкулёза и микобактериозов / В.И. Литвинов, **Е.Ю. Носова**, М.А. Краснова, К.Ю. Галкина, А.А. Букатина, А.М. Мороз // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 5. – С.4-8
5. Мороз, А.М. Комплексная экспресс-диагностика возбудителя туберкулеза и его лекарственная чувствительность к препаратам I и II ряда / А.М. Мороз, И.Р. Дорожкова, М.В. Макарова, З.П. Абрамова, **Е.Ю. Носова**, А.А. Букатина // Туберкулез и болезни легких. – М. – 2011. – С.56-75.
6. Исаева, Ю.Д. Определение критических концентраций левофлоксацина для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* в жидкой *Middlebrook 7H9* (Bactec™MGIT™ 960) и плотной Левенштейна-Йенсена питательных средах / Ю.Д. Исаева, А.А. Букатина, Л.Ю. Крылова, **Е.Ю.**

- Носова, М.В. Макарова, А.М. Мороз** // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – №12. – С. 36-42.
7. Isaeva, Y.D. Determination of critical concentration of moxifloxacin and gatifloxacin in the Bactec MGIT 960 system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* / Y.D. Isaeva, A.A. Bukatina, L.Y. Krylova, E.Y. Nosova, M.V. Makarova, A.M. Moroz // J Antimicrob Chemother. – 2013. – V. 68(10). – P. 2274-2281.
  8. **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.
  9. **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.
  10. Макарова, М.В. Определение критической концентрации химиопрепаратов для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MycoTB / М.В. Макарова, С.Г. Сафонова, Ю.Д. Исаева, Л.Ю. Крылова, Е.Ю. Носова, В.И. Литвинов // Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунологии. – 2015, – №3, – С.63-67.
  11. **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.
  12. Михайлова, Ю.Д. Критерии оценки чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к препаратам группы фторхинолонов / Ю.Д. Михайлова, М.В.

Макарова, И.В. Перетокина, Л.Ю. Крылова, **Е.Ю. Носова**, А.Б. Кулько, С.Г. Сафонова // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2018. – №3. – С.19-25.

13. 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.

Диссертация «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики» Носовой Елены Юрьевны рекомендуется к защите на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология.

Заключение принято на заседании Учёного совета Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы» с участием сотрудников научных, клинических и лабораторных подразделений Центра.

Присутствовало на заседании 18 человек. Результаты голосования: «за» – 18 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 5 от «16» июля 2020 г.

Председатель Учёного совета,

Директор ГБУЗ МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ,

д.м.н., профессор кафедры

фтизиатрии ФГБОУ ДПО РМАНПО

Ученый секретарь

ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»,

д.м.н



Е.М. Богородская

Д.А. Иванова