

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, Носовой Елены Юрьевны на диссертационную работу Петровой Людмилы Витальевны на тему: «Характеристика биологических свойств микобактерий, выделенных в Республике Марий Эл, оптимизация алгоритма их выявления», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология (медицинские науки)

### Актуальность темы исследования

В настоящее время туберкулез, наряду с ВИЧ-инфекцией, является одной из основных причин смертности от инфекционных болезней в мире за счет возрастания числа устойчивых к противотуберкулезным препаратам (ПТП) штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), а также увеличения популяции ВИЧ-коинфицированных и лиц с ослабленным из-за пандемии COVID-19 иммунитетом.

В Республике Марий Эл (РМЭ), как и в России в целом, несмотря на тенденцию к снижению уровней заболеваемости и смертности от туберкулеза, наблюдается неуклонный рост доли туберкулеза с лекарственной устойчивостью (ЛУ) возбудителя у впервые выявленных больных и увеличение доли пациентов с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом. Это обусловлено недостаточно высокой эффективностью лечения и несоблюдением ряда мер инфекционного контроля. В результате, несмотря на достигнутые успехи в борьбе с туберкулезом, сохраняется напряженная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу.

В этой связи представляется важным оценить характер циркулирующей на территории РМЭ популяции микобактерий, включая нетуберкулезные микобактерии (НТМБ), и, в частности, всесторонне изучить динамику уровня и спектра ЛУ МБТ, мутации, ассоциированные с ЛУ, генотипы выделенных штаммов МБТ, а для НТМБ исследовать их распространенность, видовое разнообразие встречающихся в данном регионе штаммов и охарактеризовать их эпидемиологическую и клиническую значимость.

Другим важнейшим аспектом исследований является совершенствование алгоритма выявления микобактерий с использованием оптимальных для Республики Марий Эл бактериологических и молекулярно-генетических методов исследования, выбранных из широкого арсенала классических и современных методик.

В связи с вышеизложенным, диссертационная работа Петровой Л.В., посвященная изучению популяции микобактерий в РМЭ, в том числе –

резистентности микобактерий, мутаций, связанных устойчивостью к ПТП, генетического разнообразия штаммов МБТ, а также оценке эффективности различных методов диагностики микобактерий, безусловно, является своевременной и чрезвычайно актуальной.

**Степень новизны исследования, обоснованность научных положений,  
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна диссертационного исследования заключается в масштабности впервые осуществленного многолетнего мониторинга уровня, распространенности и спектра ЛУ МБТ в РМЭ, который выявил нарастание ЛУ МБТ, обуславливающее напряженность эпидемиологической ситуации по туберкулезу, и позволил прогнозировать тенденции ее дальнейшего развития.

Автором установлен спектр мутаций в генах, ответственных за устойчивость к изониазиду и рифампицину, и определена принадлежность изучаемых культур МБТ к генетическому кластеру. Выявлены наиболее часто встречающиеся варианты мутаций и генотипов у штаммов МБТ, выделенных на территории РМЭ.

Автором изучено видовое разнообразие НТМБ, выделяемых в РМЭ, и определена ЛУ наиболее часто выделяемых видов НТМБ. Установлены различия в преобладающих видах НТМБ в РМЭ по сравнению с другими регионами РФ. Составлен регистр больных, выделяющих НТМБ. Проведен анализ случаев выделения НТМБ у больных с установленным диагнозом «туберкулез».

В ходе диссертационного исследования впервые осуществлен комплексный анализ эффективности выявления микобактерий различными методами исследования и оценена обоснованность и рациональность использования в учреждениях туберкулезного и нетуберкулезного профилей РМЭ изучаемых диагностических тестов.

На большом объеме данных впервые проведена оценка результатов выявления ДНК МБТ методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на поздних циклах амплификации и выполнен анализ интерпретации полученных данных.

Диссертантом оптимизирован региональный алгоритм микробиологической диагностики туберкулёза и микобактериоза с использованием как традиционных, так и современных быстрых методов исследования, в частности, для скринингового обследования кашляющих больных в учреждениях нетуберкулёзного профиля.

Сформулированные автором научные положения, выводы и рекомендации научно обоснованы и вытекают из результатов проведенных исследований.

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

Теоретическая значимость работы заключается в получении автором новых знаний о распространенности и структуре ЛУ микобактерий, циркулирующих в РМЭ, детерминантах устойчивости к ПТП, частоте встречаемости различных генотипических линий, видовом разнообразии НТМБ, что в итоге позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую значимость популяции микобактерий в РМЭ.

Практическая значимость работы определяется разработкой автором эффективного алгоритма выявления и диагностики микобактерий в РМЭ с обоснованием необходимости широкого использования молекулярно-генетических тестов для пациентов медицинских учреждений нетуберкулезного профиля. Результаты исследования выявления ДНК МБТ методом ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации, свидетельствующие о высокой вероятности наличия туберкулеза, а также полученные знания о больных, выделяющих НТМБ, и структуре ЛУ часто встречающихся НТМБ, могут быть востребованы клиницистами при диагностике заболеваний.

Сформированная региональная рабочая коллекция штаммов микобактерий с различными спектрами ЛУ может быть использована для изучения механизмов резистентности к ПТП, тестирования противотуберкулезной активности новых лекарственных препаратов и определения их критических концентраций, а также создания молекулярно-генетических тест-систем для диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза.

Результаты диссертационного исследования, включая усовершенствованный диагностический алгоритм успешно внедрены в практическую деятельность централизованной бактериологической лаборатории РМЭ и в образовательный процесс.

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

Степень достоверности и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается значительным объемом проведенных исследований и репрезентативностью выборок экспериментального материала, использованием комплекса лабораторных методов и корректной статистической обработкой данных с применением специализированного программного обеспечения.

Диссертация выполнена в централизованной бактериологической лаборатории РПТД РМЭ в рамках исследований НИР «Микробиологическая диагностика туберкулеза и инфекционный контроль в бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений РФ» № 0515-2016-0026, РК АААА-А16-11611150004-5; «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам» №0515-2019-0015, РК АААА-А16-116032560092-3, выполнявшихся в отделе микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

Результаты диссертационной работы Петровой Л.В. представлены и обсуждены на Российских конгрессах лабораторной медицины и на заседаниях секции микробиологии и иммунологии туберкулеза Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Диссертантом опубликовано 19 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, 9 в других изданиях, 2 тезисов – в рецензируемых изданиях, 3 тезисов – в материалах конференций.

#### **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Диссертационная работа Петровой Л.В. оформлена традиционным способом, изложена на 177 страницах и состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, а также списка литературы, включающего 222 источника отечественных и зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 26 таблицами. Работа написана хорошим литературным языком, четко структурирована.

**Во введении** автор убедительно обосновывает актуальность проблемы, степень разработанности темы, цель, задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Сведения о личном вкладе автора и об апробации результатов исследования позволяют объективно оценить объем и глубину исследования.

**Материалы и методы** изложены достаточно полно. Предметом исследования служили образцы диагностического материала, выделенные от пациентов, а также штаммы микобактерий. Объектом исследования являлись пациенты учреждений общей лечебной сети и противотуберкулезной службы РМЭ.

Четко сформулированы основные положения, выносимые на защиту. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, поэтому выводы являются полностью обоснованными.

**«Обзор литературы»** изложен в Главе 1 на 30 страницах машинописного текста с цитированием 151 отечественного и 71 иностранного источника, которые использованы автором в качестве теоретического обоснования исследования. В обзоре достаточно полно описаны разные методы выявления и диагностики микобактерий, представлена их сравнительная характеристика и применяемые алгоритмы обследования пациентов. Приведены современные данные о ЛУ микобактерий, мутациях, связанных с устойчивостью, а также распространенности различных генотипов микобактерий. Большое внимание уделено характеристике НТМБ. Сведения, представленные в литературном обзоре, дают представление не только об актуальности темы, но и показывает нерешенные вопросы в исследуемых областях.

Раздел **«Результаты собственных исследований»** состоит из четырех самостоятельных глав (главы 2-5), включающих весь объем проведенных исследований.

**В главе 2** изложены данные анализа эффективности выявления МБТ различными методами исследования в учреждениях общей лечебной сети и учреждениях фтизиатрического профиля, а также проведена оценка достоверности результатов диагностики туберкулеза, полученных методом ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации.

**Глава 3** посвящена результатам многолетнего мониторинга уровня и спектра ЛУ МБТ в РМЭ; описаны мутации, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам штаммов МБТ, циркулирующих в РМЭ, для различных категорий больных, включая ВИЧ-статус; определена принадлежность изучаемых штаммов МБТ к генетическому кластеру, изучена взаимосвязь между генетическими линиями и ЛУ МБТ. Кроме того, в третьей главе представлены результаты сравнительного анализа фенотипической и генотипической устойчивости штаммов МБТ к ПТП.

**В 4 главе** дана всесторонняя характеристика НТМБ, выделяемых в РМЭ, изучено их видовое разнообразие, спектр ЛУ и процентное соотношение видов, циркулирующих в регионе.

**В главе 5** представлены результаты разработки оптимального алгоритма выявления и диагностики микобактерий в РМЭ. Накопленный в процессе

выполнения диссертационного исследования методический опыт позволил автору выстроить рациональный и эффективный алгоритм обследования пациентов с подозрением на туберкулез и/или микобактериоз.

В разделе «**Заключение**» автор анализирует полученные экспериментальные данные, подчеркивая их повизну, теоретическую и практическую значимость в сопоставлении с данными научной литературы, демонстрирует обоснованность полученных выводов и заключений.

**Выводы**, сформулированные автором, соответствуют цели и задачам диссертации и являются логическим завершением анализа результатов, полученных в ходе диссертационного исследования. На основании полученных данных автором изложены **практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы**, которые могут представлять интерес для научного сообщества, специалистов эпидемиологической службы и практического здравоохранения.

Диссертация и автореферат оформлены Петровой Л.В. согласно требованиям ГОСТ 7.0.11-2011. Содержание автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в полной мере отражает содержание, результаты и выводы диссертационной работы в необходимом объеме, соответствует тексту диссертации, в достаточной степени иллюстрировано рисунками и таблицами.

#### **Соответствие специальности**

Диссертационная работа, выполненная Петровой Л.В., по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам 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», 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

#### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по оформлению и содержанию работы Людмилы Витальевны Петровой нет. В диссертации имеется некоторое количество опечаток, которые, тем не менее, нисколько не умаляют достоинств и ценности выполненной работы.

В процессе ознакомления с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. С какого цикла амплификации (или количества копий ДНК МБТ на мл

диагностического материала) вы проводили последующее исследование по определению генетических детерминант устойчивости к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам с помощью наборов «Амплитуб-МЛУ-РВ» и «Амплитуб-FQ-РВ»?

2. Мутации в гене *gyrA* приводят к перекрестной устойчивости к препаратам группы фторхинолонов. Как Вы можете объяснить полученные расхождения в результатах бактериологического и молекулярно-генетического тестирования 19 образцов диагностического материала, в ДНК МБТ которых были выявлены мутации в этом гене, с чувствительностью к левофлоксацину при КК 1,5 мкг/мл и моксифлоксацину при 0,5 мкг/мл?

3. Есть ли у Вас данные о количестве пациентов, у которых на основании неоднократного выделения одного и того же вида НТМБ из диагностического материала был поставлен диагноз «микобактериоз»?

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Петровой Людмилы Витальевны на тему: «Характеристика биологических свойств микобактерий, выделенных в республике Марий Эл, оптимизация алгоритма их выявления» является законченной научной работой, в которой на основании выполненных автором обширных исследований решена научно-практическая проблема по изучению распространенности и структуре лекарственной устойчивости популяции туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в Марий Эл, что позволило оптимизировать региональный алгоритм с использованием современных молекулярно-генетических и бактериологических методов для повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулёза и микобактериозов.

Диссертационная работа Петровой Людмилы Витальевны на тему: «Характеристика биологических свойств микобактерий, выделенных в республике Марий Эл, оптимизация алгоритма их выявления» представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751,

от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Петрова Людмила Витальевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – микробиология.

**Официальный оппонент:**

Ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «МНПЦБТ ДЗМ»)

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел.: 8(499) 268-00-05

e-mail: cbt@zdrav.mos.ru

Доктор медицинских наук

*22.01.2024*

Подпись Носовой Елены Юрьевны заверяю

Носова Елена Юрьевна

Ученый секретарь

ГБУЗ «МНПЦБТ ДЗМ»

107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел.: 8(499) 268-00-05

e-mail: cbt@zdrav.mos.ru

Доктор медицинских наук



Иванова Диана Александровна