

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Диссертационное исследование Вязовой Анны Александровны выполнено на актуальную тему, так как посвящено улучшению эпидемиологической ситуации по туберкулезу в России на основе систематизации данных микробиологического мониторинга глобальной и территориальных популяций *M. tuberculosis* с использованием комплекса молекулярно-генетических методов исследования для изучения эволюции возбудителя, своевременной оценки клинической и эпидемиологической значимости циркулирующих штаммов в целях оптимизации контроля туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. (МЛУ-ТБ). Важнейшей задачей здравоохранения является улучшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу, которая может зависеть, как от качества проводимых противоэпидемических мероприятий, так и от биологических свойств возбудителя, циркулирующего на данной конкретной территории. Популяция *M. tuberculosis* обладает выраженной генетической неоднородностью. Специфические для штаммов генетические характеристики обуславливают различия в иммунном ответе хозяина на инфекцию, спектр лекарственной устойчивости, клинические, патогенетические и эпидемиологические особенности заболевания.

Достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнения

Выборка содержит репрезентативное число наблюдений. Изучены образцы ДНК 828 штаммов *M. tuberculosis* из коллекции СПб НИИФ. В зависимости от поставленных задач исследованы три группы штаммов *M. tuberculosis*. Первая группа включала 720 образцов, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в восьми регионах СЗФО с января 2014 г. по декабрь 2019 г. Вторая группа - 67 штаммов, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в Псковской области в более ранние годы (2008–2009 гг.), использовалась для оценки динамических изменений популяции *M. tuberculosis* в данном регионе. Третья группа включала 43 серийных изолятов *M. tuberculosis* от 11 больных МЛУ-ТБ, получавших лечение беквакином в противотуберкулезном диспансере Калининградской области в 2018–2019 гг.

В работе автором применялись современные молекулярно-генетические (мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), сполиготипирование, MIRU-VNTR-типирование, полногеномное секвенирование) и микробиологические (идентификация изолятов туберкулезных микобактерий до вида с использованием набора реагентов HAIN-GenoType MTBC (Hain Lifescience, Германия), определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к препаратам основного и резервного ряда непрямым методом абсолютных концентраций на твердых питательных средах и методом пропорций в жидкой среде Middlebrook 7H9 (ВАСТЕС MGIT 960 (BD, США)) методы исследования. Все использованные методы адекватны поставленным задачам. Применялись современные методы статистической обработки результатов исследования, а именно описательной статистики и анализ непараметрических данных на платформе онлайн-сервиса StatTech v. 1.2.0 (ООО «Статтех», Россия) интернет-портала «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html>). Для установления статистической значимости различий между группами использовали критерий хи-квадрат Пирсона, точный критерий Фишера для четырехпольной и произвольных таблиц, отношение шансов (OR) и отношение рисков (RR). Для оценки аллельного полиморфизма

локусов и дискриминирующей способности MIRU-VNTR-типирования вычисляли индекс разнообразия Хантера-Гастона (HGI, Hunter Gaston Index), уровень кластеризации (Clustering Rate) штаммов. Построение дендрограмм проводили на платформе онлайн-базы данных MIRU-VNTRplus и с использованием алгоритма Unweighted pare group method (UPGMA). Для анализа родства между штаммами на основе полиморфизма 24 локусов MIRU-VNTR использовали алгоритм построения минимального связующего дерева (MST, minimum spanning tree) (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces#>).

Объективность и обоснованность научных положений и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется четкими методологическими подходами к решению поставленных задач. Целью работы Вязовой А.А. являлось изучение генетического разнообразия *M. tuberculosis*, выявления мутаций устойчивости к противотуберкулезным препаратам, установление распространенности генотипов *M. tuberculosis*, ассоциированных с первичной МЛУ возбудителя в популяции на Северо-Западе России с использованием комплекса молекулярно-генетических методов исследования.

В соответствии с целью исследования, автором были поставлены и успешно решены 6 задач, которые позволили решить следующие вопросы: провести генотипирование штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных впервые выявленным туберкулезом легких; определить принадлежность штаммов *M. tuberculosis* к филогенетическим линиям/сублиниям, генетическим семействам и кластерам; провести сравнительный анализ фенотипической и генотипической устойчивости *M. tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам различных генотипов на территориях Северо-Запада России; выявить ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью генотипы/кластеры штаммов и оценить их эпидемиологическую значимость с учетом региональных особенностей заболеваемости туберкулезом в Северо-Западном федеральном округе; изучить спектр мутаций, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* к бедаквилину, методом полногеномного секвенирования; разработать способы быстрой идентификации актуальных вариантов генетического семейства Beijing и алгоритм генотипирования штаммов *M. tuberculosis*.

Научная новизна

Работа несомненно обладает научной новизной. Автором проведен молекулярно-генетический мониторинг распределения генотипов *M. Tuberculosis* в субъектах Северо-Западного федерального округа, в которых было установлено увеличение доли штаммов генотипа Beijing МБТ с первичной множественной лекарственной устойчивостью с превалированием штаммов современной сублинии, принадлежащие к глобально распространенным генотипам B0/W148 и Central Asian/Russian (субтип CAO, впервые выявленный на территориях Северо-Запада России). Установлено, что высокая доля штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, принадлежала к кластеру 100-32 B0/W148 и распространена среди больных туберкулезом трудоспособного возраста. Впервые в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России выявлены ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью кластеры 1065-32 Central Asian/Russian, 1071-32 древней сублинии Beijing и SIT262/Ural, представляющие потенциальную эпидемиологическую опасность. Установлены новые и ранее не известные в России и мире профили сполитипирования SIT4165, SIT4250 и SIT4252 *M. tuberculosis*, полученные в Северо-Западном федеральном округе и депонированные в международную базу данных SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>). Впервые разработан способ идентификации генотипа Central Asian/Russian *M. tuberculosis* на основе аллель-специфической ПЦР-РВ для обнаружения уникальной замены G>A в позиции 294 гена *sigE* (Патент на изобретение РФ № 2689800), способ выявления субтипа CAO Central Asian/Russian Beijing *M. tuberculosis* на основе мультиплексной ПЦР для обнаружения

генотип-специфической вставки IS6110 в межгенной области Rv1359 – Rv1360 (Патент на изобретение РФ № 2735415). Впервые разработан способ установления принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к современной или древней филогенетических сублиний генотипа Beijing на основе мультиплексной ПЦР-РВ для обнаружения замен GGA>CGA в кодоне 58 гена *mutT2* и CGG>GGG в кодоне 48 гена *mutT4* для (Патент на изобретение РФ № 2743365). Впервые разработан способ определения принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к кластеру 1071-32 древней сублинии Beijing на основе ПЦР-РВ для выявления замены нуклеотида 222C>T в гене Rv0144 (Патент на изобретение РФ № 2768021). Получены новые и ранее не известные данные о мутациях в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305), формирующие устойчивость к бекваквину. На основе полученных результатов были созданы электронные информационные базы данных («Сполигопрофили *Mycobacterium tuberculosis* на Северо-Западе России», ФИПС № 2014620898 и «Сполигопрофили штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Республике Коми», ФИПС № 2019622064), включающие уникальные характеристики штаммов (сполиготип, принадлежность к генетическому семейству, профиль фенотипической устойчивости к противотуберкулезным препаратам), которые могут применяться для изучения региональных особенностей и глобального разнообразия популяций возбудителя туберкулеза.

Научно-практическая значимость

Проведенный на территории Северо-Запада России с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов исследования мониторинг за распространением *M. tuberculosis* позволил получить новые данные о генетическом разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам. Было установлено, что в восьми субъектах Северо-Западного федерального округа структура популяции *M. tuberculosis*, выделенных от больных с впервые выявленным туберкулезом легких, неоднородна: 57,1% штаммов принадлежали к генотипу Beijing Восточно-Азиатской филогенетической линии (L2), остальные (non-Beijing) – к семействам T (14,2%), LAM (11,9%), Ural (7,1%), Haarlem (5,3%), S и X (суммарно 1,6%) Евро-Американской линии (L4).

Разработаны новые теоретические аспекты, расширяющие границы представлений о значении разнообразия популяции *M. tuberculosis* в условиях значительного распространения туберкулеза с лекарственной устойчивостью возбудителя. Выявлены связи между первичной множественной лекарственной устойчивостью, ассоциированной с определенным спектром мутаций, и принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к различным генотипам, что имеет важное практическое значение, так как позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую значимость возбудителя. Так было установлено, что среди штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью 83,7% принадлежали к генотипу Beijing. Доминирующими мутациями, ассоциированными с лекарственной устойчивостью к рифампицину и изониазиду были мутациями гена *rpoB* Ser531Leu и *katG* Ser315Thr. Штаммы Beijing Central Asian/Russian отличались от B0/W148 разнообразием спектра мутаций в гене *rpoB* и более высокой частотой мутаций в гене *inhA*. Предложенный алгоритм генотипирования штаммов *M. tuberculosis*, включающий разработанные способы быстрого выявления основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний *M. tuberculosis* Beijing, могут быть использованы для слежения за циркулирующей штаммов определенных генотипов и характеристики динамики пространственно-временной структуры популяции *M. Tuberculosis* и имеет большое эпидемиологическое значение. Особенно важным является получение новых данных о механизмах формирования лекарственной устойчивости к бекваквину, новому антибактериальному препарату, широко применяемому в лечении больных с туберкулезом с множественной и широкой устойчивостью возбудителя. Важное

научное значение имеет формирование коллекции ДНК штаммов, представляющих различные генетические семейства и кластеры, для исследования геномики и протеомики *M. tuberculosis* и оценки эффективности новых противотуберкулезных средств.

Результаты диссертационного исследования могут быть внедрены в практику работы лабораторной службы медицинских учреждений, оказывающих специализированную помощь по профилю «фтизиатрия» и «инфекционные болезни (ВИЧ-инфекция)», областного, краевого, республиканского уровня, а также использованы в процессе преподавания фтизиатрии, как на студенческих кафедрах, так и на кафедрах постдипломного образования в учреждениях высшего профессионального медицинского образования при изучении вопросов эпидемиологии туберкулеза, микробиологии туберкулеза, лабораторной диагностики, лечения больных туберкулезом.

Результаты генотипирования *M. tuberculosis* внедрены в практическую деятельность бактериологической лаборатории ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России и в работу микробиологической лаборатории ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер имени Галины Доржиевны Дугаровой», г. Улан-Удэ, а также широко используются в образовательном процессе учебного отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, в образовательных учреждениях высшего медицинского образования: ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Архангельск, в ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова». Внедрение результатов диссертационного исследования в научную, учебную и практическую деятельность подтверждены актами внедрения.

Оценка завершенности диссертации

Объем и содержание соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Диссертация Вязовой А.А. построена по традиционному плану, изложена на 277 страницах машинописного текста, состоит из введения (включающее методологию и методы исследования), обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка литературы и 4 приложений. Работа иллюстрирована 89 таблицами и 39 рисунками. Список литературы содержит 338 источников, в том числе 85 отечественных и 253 иностранных. Материалы диссертации отражены в большом числе публикаций: 59 печатных работ, из них 46 публикаций в рецензируемых изданиях. Получено 4 – патента на изобретение и 2 свидетельства о регистрации базы данных. Основные положения, представленные в диссертации доложены более, чем на 20 конференциях Всероссийского и международного уровня. Текст автореферата позволяет считать диссертационную работу Вязовой А.А. завершенной научно-квалификационной работой.

Заключение

Анализ автореферата показал, что диссертационная работа Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит решение важной научной и практической проблемы – повышения качества оценки эпидемиологической ситуации по туберкулезу, основанной на получении новых знаний о штаммах *M. tuberculosis* циркулирующих на территориях Северо-Запада России, изучения с учетом критериев оценки генетической структуры и характеристики лекарственной устойчивости

возбудителя туберкулеза с использованием комплекса молекулярно-генетических методов исследования.

По актуальности, научной новизне, практической значимости, объему исследований, научно-методическому уровню, структуре и объему диссертационная работа Вязовой Анны Александровны полностью отвечает требованиям п. 9,10 «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 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Вязовая Анна Александровна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Автореферат и отзыв на него обсуждены на заседании кафедры фтизиатрии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского (протокол № 5 от 1.09.2023 г).

Заведующий кафедрой фтизиатрии
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского
Минздрава России доктор медицинских наук
(научная специальность 14.01.16 - Фтизиатрия), профессор,
Почетный работник высшего профессионального образования РФ,
Заслуженный врач РФ

Морозова Татьяна Ивановна

Профессор кафедры фтизиатрии
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, доктор
медицинских наук
(научная специальность 14.00.26 – Фтизиатрия,
14.00.36 – Аллергология и иммунология), доцент

Салина Татьяна Юрьевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Адрес: 410012, Приволжский федеральный округ, Саратовская область, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112. Тел +7(8452)27-33-70, +7(8452)49-33-03. E-mail: meduniv@sgmu.ru.
Адрес официального сайта организации: <https://sgmu.ru>

Подписи д.м.н., профессора Морозовой Т.И. и д.м.н. Салиной Т.Ю. заверяю:
Ученый секретарь ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава России
д.м.н., доцент

Липатова Татьяна Евгеньевна



04.09.2023