

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Севастьяновой Элины Викторовны на диссертационную работу Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

### Актуальность темы исследования

Согласно прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в ближайшее десятилетие туберкулез, наряду с ВИЧ-инфекцией, останется одной из основных причин смертности от инфекционных болезней в мире за счет нарастания циркуляции устойчивых к противотуберкулезным препаратам штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, а также увеличения популяции ВИЧ-коинфицированных и лиц с ослабленным из-за пандемии COVID-19 иммунитетом.

В России с 2008 г., невзирая на тенденцию к снижению уровней заболеваемости и смертности от туберкулеза, наблюдается неуклонный рост доли туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) у впервые выявленных больных и увеличение доли пациентов с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом (ВИЧ/ТБ). Это обусловлено недостаточно высокой эффективностью лечения и несоблюдением ряда мер инфекционного контроля. В результате, несмотря на достигнутые успехи, в стране сохраняется напряженная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу.

В отличие от других видов микроорганизмов у *M. tuberculosis* понятие «множественная лекарственная устойчивость (МЛУ)» имеет четкое определение: устойчивость к специфической комбинации наиболее эффективных до недавнего времени противотуберкулезных препаратов – рифампицину и изониазиду независимо от устойчивости к другим антимикробным препаратам.

Второй особенностью *M. tuberculosis* является формирование лекарственной устойчивости (в т.ч. МЛУ) за счет накопления мутаций в отсутствие горизонтального (опосредованного плазмидами) переноса генов. Поэтому рекомендованная ВОЗ новая схема лечения МЛУ-ТБ с использованием, в частности, бедаквилина, не исключает формирования устойчивости возбудителя и к этому препарату за счет геномных мутаций возбудителя. Несмотря на прогресс в изучении генетических механизмов лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, в т.ч. с использованием полногеномного секвенирования штаммов возбудителя, проблема сохраняет не только научный, но и практический интерес. В этой связи, в 2021 году ВОЗ опубликовала первый каталог мутаций с оценкой их частоты и ассоциации с фенотипической лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis*, который будет пополняться по мере получения новых знаний в данной сфере.

Другим важнейшим глобальным аспектом исследований *M. tuberculosis* в условиях неуклонного распространения МЛУ-ТБ является изучение закономерностей и направлений микроэволюции возбудителя с оценкой эпидемиологической и клинической значимости генотипов, представленных в гетерогенных микробных популяциях. В настоящее время вид *M. tuberculosis* насчитывает несколько филогенетических линий, включающих множество вариантов, которые различаются не только по набору мутаций лекарственной устойчивости, но и по комбинации ряда независимых хромосомных маркеров, влияющих, в частности, на бактериальный фитнес и трансмиссивность МЛУ-штаммов. Однако отсутствие единых подходов к использованию молекулярно-генетических методов мониторинга популяций *M. tuberculosis* существенно затрудняет прогнозирование тенденций развития эпидемической ситуации и оптимизацию мероприятий по контролю распространения возбудителя.

Таким образом, *M. tuberculosis*, как основной этиологический агент туберкулеза человека, является актуальным бактериальным патогеном, требующим всестороннего изучения с использованием широкого арсенала

современных микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования. В этой связи, диссертационная работа Вязовой А.А., посвященная изучению генетического разнообразия, мутаций устойчивости к противотуберкулезным препаратам и распространенности генотипов, ассоциированных с первичной множественной лекарственной устойчивостью штаммов, в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России, безусловно, является своевременной и чрезвычайно актуальной.

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

Научная новизна выполненных исследований генетического разнообразия и мутаций устойчивости к противотуберкулезным препаратам с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов исследования не вызывает сомнения, а достижение основной цели исследования – установления распространенности генотипов и оценки клинико-эпидемиологической значимости генотипов, ассоциированных с первичной множественной лекарственной устойчивостью штаммов, в популяции *M. tuberculosis* имеет огромное практическое значение, поскольку способствует повышению эффективности мер по контролю туберкулеза.

Научная новизна диссертационного исследования обусловлена масштабностью впервые осуществленного молекулярно-генетического мониторинга популяции *M. tuberculosis*, который выявил неравномерность распределения генотипов и кластеров возбудителя на территориях Северо-Запада России при доминировании штаммов современной сублинии генетического семейства Beijing, принадлежащих к глобально распространенным вариантам B0/W148 и Central Asian/Russian (включая субтип CAO, впервые обнаруженный на территориях Северо-Запада России).

Одной из задач, поставленных автором, было выявление ассоциации множественной лекарственной устойчивости с принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к определенным генотипам/кластерам и оценка их эпидемиологической значимости с учетом региональных особенностей заболеваемости туберкулезом в Северо-Западном федеральном округе. В ходе работы было установлено, что в кластерах 1071-32 генотипа Beijing древней сублинии, 100-32 и 4737-32 современной сублинии B0/W148, 1065-32 Central Asian/Russian доля штаммов с множественной лекарственной устойчивостью превышала 80%. И существенным выводом работы является то, что циркуляция на территориях СЗФО с высокими показателями заболеваемости туберкулезом (Калининградская область и Республика Коми) штаммов с множественной лекарственной устойчивостью кластера 100-32, наряду с тенденцией к их распространению среди молодых возрастных групп, свидетельствует об эпидемиологической значимости генотипа B0/W148 Beijing.

В ходе диссертационного исследования разработаны и апробированы способы установления принадлежности штаммов *M. tuberculosis* к современной или древней филогенетическим сублиниям генотипа Beijing, генотипу Beijing Central Asian/Russian (другое наименование – кластер 94-32), кластеру 1071-32 древней сублинии Beijing на основе аллель-специфической ПЦР в формате реального времени. Впервые разработан способ выявления субтипа CAO Central Asian/Russian Beijing *M. tuberculosis* на основе мультиплексной ПЦР. Новизна и уникальность данных результатов подтверждена патентами Российской Федерации.

Полученные автором новые для Российской Федерации данные существенно расширяют современные представления о спектре мутаций устойчивости к бедаквину в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305) *M. tuberculosis*. Показано, что основной механизм устойчивости к бедаквину у штаммов *M. tuberculosis* B0/W148 и CAO связан с мутациями в различных участках гена *mmpR* (Rv0678),

обеспечивающих эффлюкс препарата из микробной клетки.

Автором выявлены и депонированы в международную базу данных SITVIT2 новые профили сполиготипирования *M. tuberculosis*, ранее неизвестные в России и за ее пределами. Созданы электронные информационные базы данных («Сполиго профили *Mycobacterium tuberculosis* на Северо-Западе России», ФИПС № 2014620898 и «Сполиго профили 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.

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

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

Теоретическую и практическую значимость работы трудно переоценить, поскольку полученные данные вносят весомый вклад в понимание как молекулярно-генетических механизмов формирования лекарственной устойчивости, так и эволюции возбудителя туберкулеза.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что получены новые знания о генетическом разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам. Убедительно продемонстрирована неравномерность распределения генотипов в гетерогенных территориальных популяциях *M. tuberculosis* в Северо-Западном федеральном округе России. Установление связи между первичной множественной лекарственной устойчивостью, ассоциированной с определенным спектром мутаций в генах *rpoB* и *katG* (в т.ч., в сочетании с *inhA*), и принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к

различным генотипам, позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую значимость возбудителя.

Практическая значимость полученных автором результатов заключается в разработанных способах и эффективном алгоритме ускоренного генотипирования *M. tuberculosis* для выявления и слежения за циркуляцией штаммов основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний Beijing и характеристики динамики пространственно-временной структуры популяции *M. tuberculosis* в целом. Разработанные электронные базы данных применимы для накопления и сравнительного анализа информации о генотипах штаммов при проведении молекулярно-генетического мониторинга *M. tuberculosis*. Депонирование полногеномных последовательностей серийных изолятов *M. tuberculosis* в международном банке данных (GenBank NCBI) вносит существенный вклад в понимание механизмов формирования МЛУ к бедаквилину. Сформированная коллекция ДНК штаммов, представляющих различные генетические семейства, линии/сублинии и кластеры, может быть использована для исследования геномики и протеомики *M. tuberculosis* и оценки эффективности новых противотуберкулезных соединений и вакцин.

Результаты диссертационного исследования успешно внедрены в практическую деятельность бактериологической лаборатории и в образовательный процесс Учебного отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России – в программы повышения квалификации врачей, в курс лекций на кафедрах эпидемиологии, общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, на кафедре фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Архангельск, в образовательный процесс на кафедре поликлинической терапии и профилактической медицины с курсом общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» и

в работу микробиологической лаборатории ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер имени Галины Доржиевны Дугаровой», г. Улан-Удэ.

### **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 (включая полногеномное секвенирование) и корректной статистической обработкой данных с применением специализированного программного обеспечения и международных баз данных.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург) в рамках темы научно-исследовательской работы: «Разработка проблемы генетического разнообразия и изменчивости патогенных микобактерий (возбудителей туберкулеза и микобактериоза) и вакцины БЦЖ и научное обоснование лабораторных методов исследования нового поколения для диагностики и мониторинга популяций» (2015-2020 гг., АААА-А16-116061410036-3) и «Молекулярная и геномная эпидемиология туберкулеза и микобактериоза: оценка динамических изменений структуры популяций возбудителей и эффективности лабораторных методов нового поколения для диагностики и мониторинга» (2021-2025 гг., АААА-А21-121021600206-5).

Результаты диссертационной работы Вязовой А.А. представлены и обсуждены на 28 научных и научно-практических мероприятиях международного и всероссийского уровней. Диссертантом опубликовано 59 печатных работ, из них: 34 статьи в рецензируемых изданиях, 12 – тезисы в рецензируемых изданиях, 9 – тезисы в сборниках трудов и материалах конференций, 4 – патенты на изобретение. Получено два свидетельства о регистрации базы данных.

## Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа А.А. Вязовой изложена на 277 страницах, содержит 89 таблиц и 39 рисунков. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и четырех приложений.

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 позволяет объективно оценить объем и глубину исследования.

Материалы и методы изложены достаточно полно. Так, для решения поставленных задач автором была разработана адекватная методология изучения популяционной структуры *M. tuberculosis* на основе общенаучных репрезентативных методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформационных и статистических. Предметом исследования служили биологические (генотипические и фенотипические) свойства штаммов *M. tuberculosis*. Объектом исследования являлись образцы ДНК штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких. Следует положительно отметить тщательное определение критериев включения в исследование образцов ДНК штаммов *M. tuberculosis*, выделенных до начала лечения пациентов, наличие сопроводительной клинической и эпидемиологической информации.

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

Первая глава (глава 1) представляет обзор литературы с цитированием 338 отечественных и иностранных источников, который использован автором в качестве теоретического обоснования исследования. В обзоре достаточно полно



представлены современные данные о биологии, механизмах и диагностике лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза, описаны методы генотипирования *M. tuberculosis*, приведены сведения о молекулярно-эпидемиологических исследованиях возбудителя в России. Обзор дает полное представление не только об актуальности темы, но и показывает нерешенные вопросы в области изучения закономерностей распространения МЛУ-ТБ.

Раздел «Результаты собственных исследований» состоит из пяти самостоятельных глав (главы 2-6), включающих весь объем проведенных исследований. Во второй главе дана характеристика групп впервые выявленных больных туберкулезом в регионах СЗФО, включающая пол, возраст, место проживания, ВИЧ-статус и др. Выявлены статистически значимые различия в структуре клинических диагнозов в зависимости от региона СЗФО. В третьей главе приведена детальная молекулярно-генетическая характеристика популяции возбудителя туберкулеза в восьми регионах СЗФО. В четвертой главе представлены результаты сравнительного анализа фенотипической и генотипической устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis* различных генотипов, выявлены ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью генотипы/кластеры. Дана подробная генетическая характеристика штаммов *M. tuberculosis* Beijing и различных сполиготипов/семейств non-Beijing. Установлено преобладание штаммов генотипа B0/W148 Beijing *M. tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-позитивных больных с впервые выявленным туберкулезом. В пятой главе представлены результаты разработки и апробации ускоренных способов генотипирования штаммов генетического семейства Beijing *M. tuberculosis* на основе ПЦР. Накопленный в процессе выполнения диссертационного исследования методический опыт позволил автору выстроить алгоритм ускоренного генотипирования штаммов при исследовании популяций *M. tuberculosis*. В шестой главе описаны мутации резистентности к бедаквину

серийных изолятов *M. tuberculosis*, полученных от больных МЛУ-ТБ в процессе лечения препаратом.

В разделе «Заключение» автор анализирует полученные экспериментальные данные, подчеркивая их новизну, теоретическую и практическую значимость в сопоставлении с данными научной литературы, подводит итог выполненной работы, обозначает перспективы дальнейших исследований.

Выводы соответствуют цели и задачам диссертации, убедительно аргументированы полученными в ходе исследования достоверными данными.

В разделе «Практические рекомендации» определены основные предложения, которые могут представлять интерес для научного сообщества, специалистов эпидемиологической службы и практического здравоохранения.

Работа написана хорошим литературным языком, четко структурирована. В диссертации имеется некоторое количество опечаток, которые, тем не менее, несколько не умаляют достоинств и ценности выполненной работы.

Диссертация выполнена на современном научном и методическом уровне с использованием методов, адекватных поставленным задачам исследования. Принципиальных замечаний к диссертации нет.

Однако в процессе ознакомления с диссертацией возник следующий вопрос. Почему с помощью полногеномного секвенирования изучали мутации, ассоциированные с устойчивостью *M. tuberculosis* именно к бедаквилину, несмотря на то, что в современные схемы лечения МЛУ-ТБ включены и другие резервные противотуберкулезные препараты, в частности новый препарат линезолид?

Следует подчеркнуть, что отдельные незначительные замечания в целом и заданный вопрос не носят принципиального характера в плане высокой оценки работы диссертанта и не снижают общего положительного впечатления от проделанной работы.

Диссертация и автореферат оформлены Вязовой А.А. 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 иллюстрирован рисунками и таблицами.

### **Соответствие специальности**

По тематике, методам исследования, научным положениям и выводам диссертационная работа Вязовой А.А. соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.11 – микробиология (биологические науки) и области исследования: пункты 1 – «Проблемы эволюции микроорганизмов, установление их филогенетического положения», 3 – «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов», 4 – «Исследование микроорганизмов на популяционном уровне».

### **Заключение**

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 законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором обширных исследований осуществлено решение важной научной проблемы в области биологии возбудителя туберкулеза – получение новых знаний о пространственно-временной динамике генетической структуры популяции *M. tuberculosis* на территории Северо-Запада России в условиях широкого распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Вязовой Анны Александровны полностью отвечает 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 «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.

**Официальный оппонент:**

Ведущий научный сотрудник отдела микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; телефон: +7 (499) 785-90-91; e-mail: elinasev@yandex.ru

Доктор биологических наук

Севастьянова Элина Викторовна

Подпись Э.В. Севастьяновой заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; телефон: +7 (499) 785-91-54; e-mail: n.zolotova@ctri.ru

кандидат психологических наук



Золотова Наталья Владимировна

17 октября 2023