

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова»

кандидат медицинских наук,

Артемьева Ольга Владимировна



« 27 » сентября 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» о научно-практической ценности 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

Актуальность темы выполненной работы

Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) остается одной из глобальных проблем здравоохранения. Одновременная устойчивость МЛУ-штаммов *M. tuberculosis* к основным препаратам – рифампицину и изониазиду - требует применения новых дорогостоящих противотуберкулезных препаратов. Рекомендованная ВОЗ новая схема лечения МЛУ-ТБ с использованием, в частности, бедаквилаина, не исключает формирования устойчивости и к этому препарату.

Проводимые уже более 30 лет молекулярно-генетические исследования возбудителя туберкулеза способствовали формированию представлений о принадлежности *M. tuberculosis* к числу строго клональных видов, подразделяемых на филогенетические линии/сублинии, семейства и кластеры, различающиеся по географическому распределению и ассоциации с субпопуляциями человека, способности к передаче, вирулентности и развитию лекарственной устойчивости за счет геномных мутаций возбудителя, спектр которых неуклонно расширяется. Однако подобные исследования до настоящего времени ограничены изучением доступных выборок штаммов и различных по дискриминирующей способности методов исследования, что затрудняет интерпретацию результатов мониторинга популяций *M. tuberculosis*, прогнозирование тенденций развития эпидемической ситуации и оптимизацию мероприятий по контролю передачи возбудителя.

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 с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов исследования, является актуальной и представляет значительный научный и практический интерес.

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

Научная новизна диссертационного исследования несомненна. Молекулярно-генетический мониторинг впервые выявил неравномерность распределения генотипов *M. tuberculosis* и увеличение доли штаммов генотипа Beijing с первичной множественной лекарственной устойчивостью в субъектах

Северо-Западного федерального округа. Автором показано, что в структуре изученной популяции *M. tuberculosis* доминируют штаммы современной сублинии генетического семейства Beijing, принадлежащие к глобально распространенным генотипам B0/W148 и Central Asian/Russian, впервые на территориях Северо-Запада России выявлены штаммы Beijing субтипа CAO.

Выявленная высокая доля штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, принадлежащих к кластеру 100-32 B0/W148 Beijing, среди больных туберкулезом трудоспособного возраста (в т.ч. ВИЧ-позитивных), свидетельствует об эпидемическом характере распространения и клинической значимости данного генотипа *M. tuberculosis* на территориях Северо-Запада России с высокой плотностью населения.

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 эпидемическую опасность.

Новые профили сполиготипирования *M. tuberculosis*, полученные в Северо-Западном федеральном округе и ранее неизвестные в России и за ее пределами, были депонированы в международную базу данных SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>). Сполигопрофилям, описанным в мире впервые, присвоены номера – SIT4165, SIT4250 и SIT4252.

Впервые на основе ПЦР разработаны защищенные патентами на изобретение способы идентификации генотипа Central Asian/Russian (другое наименование – кластер 94-32), субтипа CAO Central Asian/Russian Beijing, принадлежности штаммов к современной или древней филогенетическим сублиниям и к кластеру 1071-32 древней сублинии генотипа Beijing *M. tuberculosis*.

Полученные новые для Российской Федерации данные о мутациях устойчивости к бедаквилину в генах *mmpR5* (Rv0678) и *atpE* (Rv1305) расширяют современные представления о спектре генов резистентности

M. tuberculosis. Показано, что основной механизм устойчивости к бедаквилину у штаммов *M. tuberculosis* B0/W148 и CAO связан с мутациями в различных участках гена *mmpR* (Rv0678), обеспечивающих эффлюкс препарата из микробной клетки.

Созданы электронные информационные базы данных, содержащие спוליгопрофили штаммов *M. tuberculosis* на Северо-Западе России и штаммов, циркулирующих в Республике Коми, которые могут применяться для изучения региональных особенностей и глобального разнообразия популяций возбудителя туберкулеза.

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

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа А.А. Вязовой выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека: «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).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Результаты, полученные автором, имеют существенное теоретическое и практическое значение.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что в результате многолетнего исследования с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов на обширной территории Северо-Запада России впервые изучена пространственно-временная структура популяции *M. tuberculosis* и получены новые данные о генетическом разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам. Приведены факты, доказывающие неравномерность распределения генотипов в гетерогенных популяциях *M. tuberculosis* в субъектах Северо-Западного федерального округа. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг выявил тенденцию к увеличению доли эволюционно «успешного» генотипа Beijing в структуре территориальных популяций *M. tuberculosis*. Установлены связи между первичной множественной лекарственной устойчивостью, ассоциированной с определенным спектром мутаций, и принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к различным генотипам, что позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую значимость штаммов возбудителя.

Разработаны теоретические положения, расширяющие границы представлений о значении разнообразия популяции *M. tuberculosis* в условиях широкого распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Выполненная работа раскрывает перспективные направления для дальнейших исследований в области молекулярной эпидемиологии туберкулеза.

Работа имеет несомненную практическую значимость. Предложенный алгоритм генотипирования штаммов *M. tuberculosis*, включающий разработанные и защищенные патентами на изобретение способы быстрого

выявления основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний *M. tuberculosis* Beijing, может быть применим для слежения за циркуляцией штаммов определенных генотипов и характеристики динамики пространственно-временной структуры популяции *M. tuberculosis*. Разработанные электронные базы данных для накопления и сравнительного анализа информации о профилях сполиготипирования (генотипах) штаммов позволяют проводить молекулярно-генетический мониторинг в целях изучения региональных особенностей и глобального разнообразия популяций возбудителя туберкулеза.

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

Достоверность полученных автором результатов работы не вызывает сомнений, определяется логически выстроенным планом исследования, направленным на решение поставленных задач, с использованием комплекса лабораторных молекулярно-генетических методов (включая полногеномное секвенирование).

Репрезентативность выборок штаммов и большой объем исследований, достаточный для корректной статистической обработки данных с применением специализированного программного обеспечения и международных баз данных, позволяют считать результаты работы достоверными.

Основные результаты диссертационного исследования Вязовой А.А. доложены и обсуждены на 28 научных и научно-практических мероприятиях международного и всероссийского уровней. Диссертантом опубликовано 34 статьи в рецензируемых изданиях, 12 тезисов в рецензируемых изданиях, 9 тезисов в сборниках трудов и материалах конференций, оформлено 4 патента на изобретение. Получено два свидетельства о регистрации базы данных.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты и выводы, полученные автором, могут быть использованы в преподавании курсов микробиологии и эпидемиологии при чтении лекций о туберкулезе в медицинских ВУЗах и учебных программах последипломного дополнительного образования для эпидемиологов и врачей-бактериологов.

Разработанные способы быстрого выявления основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний *M. tuberculosis* Beijing и созданные электронные базы данных о генотипах штаммов могут быть рекомендованы для проведения молекулярно-генетического мониторинга популяции *M. tuberculosis*.

Сформированная коллекция ДНК штаммов, представляющих различные генетические семейства, линии/сублинии и кластеры, может быть использована для исследования геномики и протеомики *M. tuberculosis*, разработки альтернативных способов выявления и мониторинга эпидемиологически и клинически значимых генотипов и кластеров возбудителя, оценки эффективности новых противотуберкулезных соединений.

Материалы диссертации Вязовой А.А. внедрены в практическую деятельность бактериологической лаборатории и используются в образовательном процессе Учебного отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России – в программы повышения квалификации врачей (акты внедрения от 01.12.2022 г.), вошли в курс лекций на кафедрах эпидемиологии, общественного здоровья и здравоохранения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт внедрения от 15.12.2022 г.), на кафедре фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Архангельск (акт внедрения от 12.12.2022 г.), 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 (акт внедрения от 14.12.2022 г.).

Соответствие специальностям

По тематике диссертации, 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».

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа Вязовой А.А. изложена на 277 страницах, иллюстрирована 89 таблицами и 39 рисунками. Диссертация состоит из введения (включающее методологию и методы исследования), обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, четырех приложений, списка литературы, включающего 338 источников, в том числе 85 отечественных и 253 иностранных. Структура и содержание диссертации, научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации в необходимом объеме представлены в автореферате и полностью соответствуют тексту диссертации. Оформление диссертации и автореферата полностью соответствуют требованиям ВАК РФ. Принципиальных замечаний по работе нет.

Отдавая должное проделанной работе и оценивая её положительно, хотелось бы узнать мнение автора по следующему вопросу: каковы, на Ваш взгляд, перспективы использования результатов мониторинга популяции и циркуляции эмерджентных генотипов возбудителя в совершенствовании вакцинопрофилактики туберкулеза?

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 актуальной научно-практической проблемы в области изучения генетического разнообразия и пространственно-временной динамики структуры популяции *M. tuberculosis*, мутаций устойчивости к противотуберкулезным препаратам, ассоциированных с первичной множественной лекарственной устойчивостью у штаммов различных генотипов, что позволило разработать способы быстрого выявления эпидемиологически и клинически значимых вариантов и алгоритм молекулярно-генетического мониторинга возбудителя туберкулеза.

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.

Отзыв на диссертационную работу Вязовой Анны Александровны заслушан и одобрен на заседании ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Протокол № 3 от 7 сентября 2023 года).

Отзыв составил:

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» 105064 г. Москва, М. Казенный пер., 5А; тел.: (495) 917-49-00; e-mail: mech.inst@mail.ru

доктор медицинских наук,
член-корреспондент РАН

Свитич Оксана Анатольевна

Подпись Свитич Оксаны Анатольевны заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

105064 г. Москва, М. Казенный пер., 5А, тел.: (495) 917-49-00, e-mail: mech.inst@mail.ru

кандидат
биологических наук



Алаторцева Галина Ивановна