

Заключение комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по докторской диссертации Вязовой Анны Александровны на тему: «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 1.5.11. - микробиология

Научный консультант: Нарвская Ольга Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики 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.

Диссертационная работа Вязовой А.А. соответствует специальности 1.5.11. – микробиология.

Диссертационная работа посвящена исследованию генетического разнообразия, фенотипической и генотипической устойчивости к противотуберкулёзным препаратам и распространённости генотипов, ассоциированных с первичной множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, в популяции *M. tuberculosis* на Северо-Западе России с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов исследования.

Проведённый А.А. Вязовой молекулярно-генетический мониторинг впервые выявил неравномерность распределения генотипов *M. tuberculosis* и нарастание доли штаммов генотипа Beijing с первичной множественной лекарственной устойчивостью в субъектах Северо-Западного Федерального округа. Показано, что в структуре изученной популяции *M. tuberculosis* доминируют штаммы современной сублинии генетического семейства Beijing, принадлежащие к глобально распространённым генотипам B0/W148 и Central Asian/Russian (субтип CAO, впервые выявленный на территориях Северо-Запада России). Отмечено, что выявленная высокая доля штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, принадлежащих к кластеру 100-32 B0/W148, среди больных туберкулёзом трудоспособного возраста (в т.ч. ВИЧ-положительных), 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 диссертантом 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 её пределами, депонированы в международную базу данных SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>). Сполгопрофилям, описанным в мире впервые, присвоены номера: SIT4165, SIT4250, SIT4252.

В ходе выполнения работы впервые разработаны и защищены патентами на изобретение РФ следующие ускоренные способы для определения генотипов возбудителя туберкулёза на основе ПЦР: идентификация генотипа Central Asian/Russian (кластер 94-32) *M. tuberculosis* на основе аллель-специфической ПЦР-РВ для обнаружения уникальной замены G>A в позиции 294 гена *sigE* (Патент на изобретение РФ № 2689800); выявление 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); установление 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), определение 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).

Полученные А.А. Вязовой новые для России 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 САО связан с мутациями в различных участках гена *mmpR* (Rv0678), обеспечивающих эффлюкс препарата из бактериальной клетки.

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 противотуберкулёзным препаратам), которые могут применяться для изучения региональных особенностей и глобального разнообразия популяций возбудителя туберкулёза.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что впервые на обширной территории Северо-Запада России с использованием единого комплекса молекулярно-генетических методов исследования изучена пространственно-временная структура популяции *M. tuberculosis* и получены новые данные о генетическом разнообразии и детерминантах устойчивости возбудителя к противотуберкулёзным 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 определённым спектром мутаций, и принадлежностью штаммов *M. tuberculosis* к различным генотипам, что позволяет оценить клиническую и эпидемиологическую значимость возбудителя. Разработаны теоретические положения, расширяющие границы представлений о значении разнообразия популяции *M. tuberculosis* в условиях широкого распространения туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя.

Практическая значимость заключается в том, что предложенный алгоритм генотипирования штаммов *M. tuberculosis*, включающий разработанные способы быстрого выявления основных генотипов и кластеров современной и древней сублиний *M. tuberculosis* Beijing на основе ПЦР, может быть применим для слежения за циркуляцией штаммов определённых генотипов и характеристики динамики пространственно-временной структуры популяции *M. tuberculosis*.

Разработанные электронные базы данных для накопления и сравнительного анализа информации о генотипах штаммов позволяют проводить молекулярно-генетический мониторинг популяции *M. tuberculosis*.

Профили сполиготипирования 408 штаммов депонированы в международную базу сполиготипов SITVIT2: SITVIT/SITVITEXTEND Database projects Institut Pasteur de la Guadeloupe, France <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2>.

Полногеномные последовательности 43 серийных изолятов *M. tuberculosis* 11 больных туберкулёзом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ), леченных бедаквилином, депонированы в международном банке данных GenBank: NCBI Sequence Read Archive

(project number PRJNA525341, PRJNA635788) *Mycobacterium tuberculosis* raw sequence reads (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA525341>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA635788>).

Сформирована коллекция ДНК штаммов, представляющих различные генетические семейства, линии/сублинии и кластеры, для исследования геномики и протеомики *M. tuberculosis* и оценки эффективности новых противотуберкулезных соединений. На представленной коллекции ДНК штаммов апробированы разработанные способы выявления генотипов, кластеров и филогенетических сублиний семейства Beijing *M. tuberculosis* методом ПЦР.

Полученные при выполнении диссертации данные генотипирования *M. tuberculosis* внедрены в практическую деятельность бактериологической лаборатории ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России (акт внедрения от 01.12.2022 г.). Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс Учебного отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России – в программы повышения квалификации врачей (акт внедрения от 01.12.2022 г.), 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.).

Достоверность полученных автором результатов обеспечивается объемом исследований, проведенных с использованием комплекса молекулярно-генетических и бактериологических методов исследования. Полученные данные подвергнуты обработке и систематизации с помощью современных биоинформационных и статистических методов. Научные положения и выводы, сформулированные А.А. Вязовой логически вытекают из результатов, полученных в ходе исследований.

По объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 1.5.11. — микробиология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Анализ проверки с помощью системы «Антиплагиат» показал, что оригинальный текст составляет 87,67%, самоцитирование – 4,61%, цитирование – 7,72%.

Материалы диссертации доложены и представлены на 28 международных, всероссийских и региональных научно-практических конференциях.

Диссертация не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 59 печатных работы, в том числе 34 статьи в рецензируемых изданиях. Получено 4 патента на изобретения РФ, 2 свидетельства о регистрации базы данных.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова). Согласие ведущей организации имеется.

В качестве официальных оппонентов предлагаются:

Суворов Александр Николаевич - член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»).

Севастьянова Элина Викторовна - доктор биологических наук (03.00.07–микробиология), ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГБНУ «ЦНИИТ»).

Макарова Марина Витальевна - доктор биологических наук (03.02.03 – микробиология), главный 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 «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»).

Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01 рекомендует диссертацию Вязовой Анны Александровны «Генетическая структура популяции и множественная лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*» по специальности: 1.5.11. – микробиология (биологические науки) к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01:

Председатель:

Главный научный сотрудник,
руководитель отдела микробиологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, профессор

А.Ю. Миронов

Члены комиссии:

Заместитель директора по клинической работе
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, доцент

Т.А. Руженцова

Главный научный сотрудник,
Руководитель отдела биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, доцент

Е.А. Воропаева

Главный научный сотрудник,
Руководитель лаборатории
диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, профессор

О.Ю. Борисова