

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Игоря Андрониковича Шагиняна на диссертационную работу Панова Григория Валентиновича на тему: «Биологические свойства и эпидемиологическая значимость *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной патологией (туберкулез/ВИЧ)», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### Актуальность и степень разработанности темы исследования.

В XXI веке наиболее распространенными социально-зависимыми инфекционными заболеваниями являются туберкулез и ВИЧ-инфекция. В XX веке массовая вакцинация и улучшение жизни в большинстве развитых стран мира позволили добиться значительных успехов в борьбе с туберкулезом, однако появление и распространение ВИЧ-инфекции в большинстве стран мира нивелировало достигнутые благоприятные тенденции и обнажили многие еще нерешенные проблемы с борьбе с туберкулезом. В условиях моноинфекции учеными во второй половине XX века на основе разработанных молекулярно-генетических методов были выявлены основные генотипы штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующие на той или иной территории, механизмы передачи инфекции, основные группы риска, уровень распространенности штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Что касается сочетанной патологии — туберкулез/ВИЧ, а именно смешанной инфекции, то на многие вопросы, от которых зависит как тактика лечения, так и профилактика обеих рассматриваемых инфекций, убедительных результатов в настоящее время не получено. Прежде всего, до сих пор нет единого мнения о путях развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных, не выявлено влияния ВИЧ-инфекции на бактериовыделение и эпидемическую значимость пациентов, не имеется четких данных о генотипах *M.tuberculosis*, выявляемых у ВИЧ-положительных больных, не выявлена способность данной категории больных передавать возбудителя в

популяции, как в здоровой, так и ВИЧ инфицированной. Эти характеристики зависят как от особенностей течения инфекционного процесса, так и свойств возбудителя, а именно скорости роста и лекарственной устойчивости к антимикробным препаратам.

Автор во введении отмечает, что в мире и в Российской Федерации проводятся исследования, направленные на изучение лекарственной устойчивости и генотипических вариантов возбудителя туберкулеза. Однако эти методы пока редко применяются конкретно для характеристики штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с положительным ВИЧ-статусом. Имеются только работы, описывающие популяцию *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией, но изолированно от основной циркулирующей в регионе популяции *M.tuberculosis*. Такой подход, к сожалению, не дает ответа на вопрос, является ли такое распределение лекарственной устойчивости и генотипов характерным именно для *M.tuberculosis*, выделенных от больных с ВИЧ-инфекцией или является особенностью региональной популяции *M.tuberculosis*.

При исследовании молекулярно-эпидемиологических особенностей штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией, разными группами исследователей получены противоположные результаты: в одних работах не установлено различий в распространении конкретных генотипических групп *M.tuberculosis* среди больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией по сравнению с общей популяцией больных туберкулезом, а в других – были выявлены ассоциации с определенным генотипом *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных.

Существуют противоречивые данные, касающиеся интенсивности бактериовыделения у ВИЧ-инфицированных больных и, следовательно, невозможно сделать выводы о степени эпидемиологической опасности таких пациентов.

Автор на материалах данных, полученных от больных в Свердловской

области, занимающей в Уральском Федеральном округе по пораженности населения туберкулезом 76-е ранговое место среди 85 субъектов РФ и 2-е место среди наиболее пораженных субъектов ВИЧ-инфекцией, постарался в своей диссертации представить основные характеристики штаммов *M.tuberculosis* выделенных от пациентов с ВИЧ-инфекцией и на основании полученных данных обосновать разработку для таких больных специальных мероприятий, направленных на предупреждение распространения особо опасных штаммов *M.tuberculosis*.

Исходя из вышеуказанного считаю, что тема диссертации Панова Г.В. является актуальной.

#### **Новизна исследования и полученных результатов.**

В диссертации четко сформулированы цель и задачи исследования.

Основной целью настоящего исследования являлись изучение биологических свойств и оценка эпидемиологической значимости возбудителя туберкулеза при сочетанной патологии ВИЧ-туберкулез на поздних стадиях заболевания.

Для решения цели Пановым Г.В. были сформулированы 4 адекватные поставленной цели задачи, которые были успешно решены в процессе выполнения темы диссертации.

Для выполнения поставленных задач автор использовал разнообразные современные методы (бактериологические, молекулярно-генетические и статистические).

Диссертационная работа Г.В. Панова состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Диссертация изложена на 140 страницах, иллюстрирована 31 таблицами и 11 рисунками. Указатель использованной литературы содержит 201 источник: 65 отечественных и 136 зарубежных.

Во введении автор объективно и четко обосновывает актуальность темы исследования, представляет данные о разработанности выбранной темы, обозначает цель и задачи работы. В данном разделе представлены также теоретическая и практическая значимость работы, описаны методология и методы исследования (микробиологические, молекулярно-генетические и статистические). Указан личный вклад диссертанта в полученные результаты, основные положения диссертации, выносимые на защиту и степень достоверности и апробация результатов. Раздел написан четко, понятно и создает благоприятное впечатление о материалах диссертации.

В главе 1 «Обзор литературы» в разделе 1.1 (1.1.1-1.1.2) последовательно представлены разнообразные данные о сочетанной патологии ВИЧ/ТБ, эпидемиологии сочетанной патологии и клинических особенностях и диагностики туберкулеза у ВИЧ-инфицированных больных.

Раздел 1.2 (1.2-1.2.3.) посвящен лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, а именно распространенности лекарственно-устойчивого туберкулеза в РФ, описанию механизмов формирования лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам. Представлены также основные подходы, используемые в диагностике лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антимикробным препаратам.

В разделе 1.3 Панов Г.В. анализирует работы, посвященные молекулярной эпидемиологии *M.tuberculosis*. В данном фрагменте диссертации представлены разнообразные методы генотипирования возбудителя туберкулеза и приведены результаты выявленных молекулярно-эпидемиологических особенностей популяции штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих в РФ.

Глава 1 «Обзор литературы» написана хорошо и соответствует цели и задачам, поставленным Г.В. Пановым в диссертации.

Результаты собственных исследований представлены в главах 2-5. В главе 2 описано изучение жизнеспособности *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом, по скорости и

массивности роста. В обеих группах большинство штаммов демонстрировало видимый рост в срок от 3 до 8 недель и по времени появления видимого роста на среде после инокуляции диагностического материала достоверных различий между группами выявить не удалось. По критерию массивности бактериовыделения также не удалось выявить достоверных различий между исследуемыми группами.

В главе 3 представлены данные, в которых автором исследовались особенности фенотипической лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* у пациентов с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ.

При анализе фенотипической лекарственной резистентности было показано, что штаммы, выделенные от ВИЧ-инфицированных больных ТБ, достоверно реже были чувствительны к противотуберкулезным препаратам, но достоверно чаще имели множественную лекарственную устойчивость, по сравнению со штаммами МБТ, выделенными от ВИЧ-негативных больных ТБ. При этом спектр лекарственной устойчивости и структура множественной лекарственной устойчивости достоверно не отличались между группами.

Глава 4 посвящена молекулярно-генетическим особенностям устойчивости к противотуберкулезным препаратам *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ.

Показано, что в группе ВИЧ/ТБ достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) выявлялись мутации, ответственные за устойчивость к рифампицину (87/165, 52,73% против 59/166, 35,54%) и мутации, ответственные за устойчивость к изониазиду (106/165, 64,24% против 80/166, 48,19%), чем в группе только больных туберкулезом.

В спектре мутаций в различных кодонах гена *proV* достоверных отличий по группам выявлено не было: чаще всего выявлялись мутации в 531 кодоне гена *proV* (73/87, 83,91% - группа I, 47/59, 79,66% - группа II), причем, как правило, в белковом продукте гена мутация приводила к замене серина на лейцин.

Также не было показано достоверных отличий при анализе спектра мутаций среди штаммов с генотипической устойчивостью к изониазиду: частота

встречаемости мутаций в 315 кодоне *katG*, в том числе в виде сочетанных мутаций, в группе I - 96,22%, а в группе II - 93,75%.

Мутации в гене *gyrA*, приводящие к возникновению устойчивости к фторхинолонам, были выявлены приблизительно на одном уровне в группе ВИЧ/ТБ в 7,27% случаях и в 7,83% - в группе больных только туберкулезом. Автор чаще всего регистрировал мутации в 94 кодоне.

Анализ сочетания мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду и рифампицину, показал, что генотип множественной лекарственной устойчивости был выявлен у 51,52% штаммов МБТ, выделенных от больных группы ВИЧ/ТБ и у 34,94% штаммов МБТ, выделенных от больных группы только с туберкулезом. Отличия между группами по этому параметру статистически достоверны ( $p < 0,01$ ). Самым частым генотипом множественной лекарственной устойчивости был *rpoB531 Ser→Leu + katG315 Ser→Thr*, наблюдавшийся в 75,29% случаев у больных с ВИЧ/ТБ и в 65,52% случаев у больных — только с туберкулезом.

Таким образом, в результате проведения сравнительного анализа спектра мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, было показано, что частота генотипической устойчивости к рифампицину и изониазиду у штаммов *M.tuberculosis* группы ВИЧ/ТБ достоверно превышала этот показатель у штаммов *M.tuberculosis* только с туберкулезом. Достоверной разницы в спектре мутаций среди генотипически устойчивых штаммов двух групп выявлено не было.

В главе 5 автором представлены данные о генетическом полиморфизме *M.tuberculosis*.

Первоначально было проведено генотипирование 308 штаммов МБТ (158 группы ВИЧ/ТБ и 150 группы только с туберкулезом) по полиморфизму локусов прямых повторов (сполиготипирование). Пановым Г.В, было показано, что штаммы МБТ группы ВИЧ/ТБ, в стадии СПИД, отличается большая степень кластеризации: в группе I было идентифицировано 28 сполигопрофилей,

распределенных по 12 кластерам, в группе II - 40 споллигопрофилей, распределенных по 14 кластерам; КАТ в группе I составил 82,28% против 73,33% в группе II. Полученные результаты могут указывать на более интенсивную передачу штаммов *M.tuberculosis* в этой группе, и скорее свидетельствует в пользу теории развития ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации и о меньшем числе источников инфицирования, чем среди больных только с туберкулезом.

С помощью использованных автором попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), позволяющего построить дендрограмму, и метода построения минимального охватывающего дерева, позволяющего определить значимые клональные комплексы (КК) было показано, что исследуемая популяция МБТ была представлена 7-ю клональными комплексами (КК), расположенными на двух главных ветвях филогенетического дерева. Ветвь 1 включала в себя КК4, состоящий из штаммов группы Beijing. Ветвь 2 была представлена 6-ю клональными комплексами МБТ, среди которых встречались штаммы с минимальным числом делеций в локусе прямых повторов (КК1), являющиеся вариантами линии T, эндемичные для Уральского региона штаммы КК3 и характерный для России клональный комплекс КК2 (варианты T5\_RUS).

На основе анализа числа кластеризованных штаммов внутри каждого КК, был определен коэффициент активности трансмиссии для *M.tuberculosis* каждого КК (таблица 7). Автором установлено, что максимальная активность трансмиссии выявлена у штаммов *M.tuberculosis*, принадлежащих к КК4 (Beijing) (КАТ=97,63%). *M.tuberculosis* клональных комплексов 2 (T5\_RUS) и 3 (H4-Ural) также характеризовались достаточно высоким уровнем трансмиссии (КАТ = 60,00% и 65,38%, соответственно). Штаммы МБТ, относящиеся к КК1, КК5 и КК6, характеризовались низким уровнем трансмиссии.

Вне зависимости от принадлежности к филогенетической группе, множественная лекарственная устойчивость чаще наблюдалась у *M.tuberculosis*, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ: МЛУ обладало 56,78% штаммов

филогенетической ветви 1 группы I против 44,21% штаммов филогенетической ветви 1 группы II и 27,50% штаммов филогенетической ветви 2 группы I против 10,91% штаммов филогенетической ветви 2 группы II. Чувствительными же чаще были штаммы *M.tuberculosis* группы только с туберкулезом: 22,88% штаммов филогенетической ветви 1 группы с туберкулезом I против 34,74% штаммов филогенетической ветви 1 группы II и 57,50% штаммов филогенетической ветви 2 группы I против 74,55% штаммов филогенетической ветви 2 группы II.

При анализе лекарственной чувствительности в зависимости от КК, было показано, что у *M.tuberculosis* КК4 (Beijing) достоверно чаще встречались полирезистентные и МЛУ штаммы (132/211, 62,56%), по сравнению со штаммами, чувствительными ко всем противотуберкулезным препаратам и с монорезистентностью (79/211, 37,44%),  $p < 0,01$ . Все штаммы МБТ, относящиеся к КК1 (варианты T1), были чувствительными или монорезистентными. Среди штаммов МБТ, принадлежащих к КК3 (варианты H4-Ural), КК5 (варианты H1) и КК6 (варианты LAM9), также преобладали чувствительные и монорезистентные штаммы (19/26 (73,08%), 6/7 и 6/8, соответственно). В КК2 (варианты T5\_RUS) с равной частотой были представлены как штаммы чувствительные и монорезистентные, так и штаммы полирезистентные и с МЛУ - по 10 штаммов каждой категории.

Столь полный и детальный анализ полиморфизма штаммов *M.tuberculosis* группы больных с сочетанной патологией и только с туберкулезом, является несомненно значительным достижением исследований Г.В. Панова, еще более значимым дополнением которому послужил бы анализ источников инфекции у сравниваемых групп больных с сочетанной инфекцией и только с туберкулезом.

Полученные Г.В. Пановым результаты, свидетельствующие о более узкой кластеризации штаммов *M.tuberculosis* и достоверно более частой множественной устойчивости этих штаммов в группе с сочетанной инфекцией, могут косвенно свидетельствовать о внутрибольничном заражении или в стационаре для больных с ВИЧ-инфекцией, или в туберкулезном отделении.



При выяснении данного вопроса и получении доказательств внутрибольничной инфекции туберкулезом больных ВИЧ-инфекцией можно разработать противоэпидемические мероприятия против распространения туберкулеза среди больных с ВИЧ-инфекцией.

В разделе «Заключение» Г.В. Пановым приведены основные результаты проведенного им исследования по теме диссертации и подчеркивается необходимость получения данных о биологических свойствах *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной патологией.

Выводы отражают основные результаты исследования и соответствуют поставленным цели и задачам работы.

На основании полученных в процессе выполнения диссертационной работы значимых результатов автором составлены практические рекомендации для микробиологов, состоящие из 4 пунктов. Наиболее значимым из них является пункт 1, рекомендующий проведение мониторинга развития туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью у категории больных с сочетанной патологией. Не менее важным являются рекомендации о тщательном контроле лекарственной чувствительности в процессе терапии для своевременного определения возможного развития резистентности.

Очень важным является раздел «Перспективы дальнейшей разработки темы». Автор планирует дальнейшее проведение исследований, направленных на изучение биологических особенностей *M.tuberculosis*, выделяемых от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией. В частности, предполагается продолжить изучение жизнеспособности *M.tuberculosis*, выделяемых от этой категории больных, в зависимости от клинической формы туберкулеза и генотипической характеристики возбудителя. Кроме того, для выявленных в регионе штаммов *M.tuberculosis* с генотипом, обеспечивающим формирование множественной лекарственной устойчивости без снижения жизнеспособности возбудителя, планируется проведение мониторинга формирования лекарственной резистентности к другим противотуберкулезным препаратам.

На наш взгляд, уже на основании имеющихся данных и дополнительного анализа заболеваемости группы пациентов с сочетанной патологией (госпитализация, лечение и т.д.) очень важным разделом данной работы должны быть исследования, направленные на выяснение источников инфекции. В случаях получения доказательств внутрибольничного инфицирования возможна разработка соответствующих противоэпидемических мероприятий.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

В диссертационной работе Г.В. Панова впервые получены данные о жизнеспособности, структуре лекарственной чувствительности и молекулярно-эпидемиологических особенностях штаммов *M.tuberculosis* при сочетанной патологии ВИЧ/ТБ. Полученные данные могут помочь при разработке для таких больных специальных противоэпидемических мероприятий, направленных на изоляцию источников инфекции, путей передачи, а следовательно, уменьшения числа случаев сочетанной патологии.

Сполигопрофили 308 штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом в Свердловской области, включены в международную базу данных SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe). Полученные автором данные генотипирования могут быть использованы для создания карты циркуляции лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis* и тех или иных клональных комплексов на территории Российской Федерации.

Автором впервые показано, что штаммы *M.tuberculosis*, выделенные от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ, отличается большая степень кластеризации, что подтверждает более интенсивную передачу возбудителя в этой группе и свидетельствует в пользу теории развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации.

Описана специфическая эпидемиологическая особенность региональных штаммов *M.tuberculosis* и выявлено преобладание штаммов, типичных для Центральной и Северной Азии, при этом штаммы, характерные для Европейского

региона, встречались реже.

Показано, что штаммы *M.tuberculosis*, относящиеся к штаммовым линиям T5\_RUS и H4-Ural, эндемичной для уральского региона, характеризовались достаточно высоким уровнем трансмиссивности, штаммы остальных малых кластеров - низким уровнем трансмиссивности.

Создана региональная рабочая коллекция штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, характеризующаяся различными профилями резистентности и принадлежностью к разным сполиготипам.

### **Внедрение результатов работы в практику**

Материал настоящего исследования используется на кафедре инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" (акт внедрения от 27.04.2017г.); в учебном процессе преподавания раздела «Частная микробиология» студентам 2-го курса лечебно-профилактического, педиатрического и медико-профилактического факультетов на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации (акт внедрения от 11.05.2017г.); в цикле лекций, посвященных туберкулезу с множественной лекарственной устойчивостью и ко-инфекцией вируса иммунодефицита человека, в отделении телемедицины и постдипломного образования научно-организационного отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (акт внедрения от 17.05.2017г.).

Автореферат и опубликованные по теме диссертации 10 научных работ (в том числе 3 работы - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ) полностью отражают содержание диссертации.

Полученные автором результаты были представлены и обсуждены на Съезде фтизиатров России «Актуальные вопросы противотуберкулезной помощи в Российской Федерации» - X съезд Российского общества фтизиатров (Воронеж, 2015); Заседании секции микробиологии и иммунологии туберкулеза Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2015, 2016); Областных он-лайн совещаниях специалистов лабораторной службы противотуберкулезных учреждений Свердловской области по итогам деятельности в 2013 и 2014 годах (Екатеринбург, 2014, 2015); цикле усовершенствования «Избранные вопросы фтизиатрии» (Екатеринбург, 2014); Совещании для врачей по использованию ускоренных методов этиологической диагностики туберкулеза в ГБУЗ СО "ПТД" (Екатеринбург, 2015); Производственном совещании по результатам организации диспансерной работы фтизиатрических подразделений за 11 месяцев 2015 года (Екатеринбург, 2015); Семинаре «Ускоренные методы этиологической диагностики туберкулеза» (Екатеринбург, 2016); Конференции сотрудников ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (Москва, 2016).

### **Заключение.**

Таким образом, диссертационная работа Панова Григория Валентиновича «Биологические свойства и эпидемиологическая значимость *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной патологией (туберкулез/ВИЧ)», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченным научно-квалификационным трудом и содержит новое решение актуальной задачи: исследование биологических свойств и оценка эпидемиологической значимости возбудителя туберкулеза при сочетанной патологии ВИЧ и туберкулез на поздних стадиях заболевания.

Диссертационная работа Панова Григория Валентиновича «Биологические свойства и эпидемиологическая значимость *Mycobacterium tuberculosis*,

выделенных от больных с сочетанной патологией (туберкулез/ВИЧ)» полностью соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменением Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 № 1024 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор – Панов Григорий Валентинович заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент,  
главный научный сотрудник,  
заведующий лабораторией молекулярной  
эпидемиологии госпитальных инфекций  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
«Национальный исследовательский центр  
эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,

доктор медицинских наук

19.11.2017г



Шагинян Игорь Андроникович

(123098, г. Москва, ул.Гамалеи, д. 18

Телефон: 8 (495) 193-30-01, e-mail info@riem.ru)

Подпись Шагиняна Игоря Андрониковича заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России  
кандидат биологических наук



Людмила Кондратьевна Кожевникова