

Заключение комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 (Д 208.046.01) 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 Носовой Елены Юрьевны на тему: «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 1.5.11. – микробиология

Научные консультанты:

Литвинов Виталий Ильич - доктор медицинских наук (03.03.03 – иммунология), профессор, академик РАН, научный руководитель Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ МНПЦ БТ, Москва).

Диссертационная работа Носовой Е.Ю. соответствует специальности: 1.5.11. - микробиология.

Работа посвящена совершенствованию лабораторной микробиологической диагностики туберкулёза с применением модифицированных методик, современных молекулярно-генетических и бактериологических технологий и изучению спектра мутаций в генах *M.tuberculosis*, связанный с развитием множественной и широкой лекарственной устойчивости. В ходе проведённых исследований Носовой Е.Ю. впервые разработаны молекулярно-генетические методики на основе ПЦР-SSCP и ПЦР-ПДРФ, позволяющие увеличить спектр анализируемых мутаций в генах *gyrA*, *gyrB* (патенты на изобретения РФ № 2343197 от 10.01.2009, № 2439162 от 10.01.2012) и *rrs*, *eis* (патенты на изобретения РФ № 2409680 от 20.01.2011, № 2509158 от 10.03.2014), ответственных за лекарственную устойчивость *M.tuberculosis* к фторхинолонам и инъекционным препаратам (аминогликозидам и капреомицину). Разработанные методики позволили увеличить выявляемость устойчивости к фторхинолонам до 97,7% (при исследовании только гена *gyrA* – 92,4%) и до 98,3% к канамицину (при исследовании только гена *rrs* – 74,6%). Диссертантом с помощью молекулярно-генетических тестов и разработанных методик получены новые данные о спектре и частоте встречаемости мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *embB*, *gyrA*, *gyrB* и *rrs*, *eis*, выявлены различия в степени устойчивости штаммов *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам, инъекционным препаратам ассоциированные с мутациями в этих генах. Показано, что большинство штаммов с заменами A90V и D94A в *gyrA* проявляют низкую степень устойчивости *M.tuberculosis* к Ofx и «промежуточную» к Mfx, а редко встречающиеся в *gyrA* (G88A, D94V, A74S и G88A/H70A/G509A) и замены в *gyrB* (N538K, D500H, D500N, N538D, T539N), обуславливают «промежуточную» степень устойчивости к обоим препаратам. Выявлены различия в степени устойчивости штаммов *M.tuberculosis* с мутациями в *rrs* (умеренная и высокая к канамицину и амикацину, умеренная и низкая к капреомицину) и *eis* (низкая и

«промежуточная» к канамицину и «промежуточная» к амикацину). Показано, что высокая и умеренная степень устойчивости к препарату в 89,9% изолятов ассоциирована с заменой S531L (79,7% изолятов) и мутациями в 526 кодоне. Впервые выявлена связь шести типов мутаций и трёх двойных (D516Y, D516G, H526N, H526C, L533P, L511P, L516G/S531W, S522L/D516G, L533P/S531L) с «промежуточной» степенью устойчивости к препарату. Показано, что генетические детерминанты устойчивости к изониазиду, представленные мутациями в гене *katG* (S315T, I335V, S315N) или в сочетании с *inhA*, *ahpC*, а также заменой c(-15)t в промоторной части гена *inhA*, в 97% изолятов приводят к высокой/умеренной степени устойчивости. Установлена высокая частота обнаружения штаммов с умеренной и высокой степенью устойчивости к рифампицину и изониазиду (штаммы с множественной лекарственной устойчивостью) опосредованная мутациями S531L в *rpoB* и S315T в *katG*. Впервые определено, что преобладающее большинство штаммов (88%) с различными типами мутаций в гене *embB* проявляют «промежуточную» устойчивость к этамбутолу.

Обоснована необходимость включения в алгоритм лабораторной диагностики туберкулёза количественного определения лекарственной чувствительности возбудителя, наряду с молекулярно-генетическим определением генетических детерминант устойчивости, для получения наиболее достоверной информации о характере и степени устойчивости возбудителя к трём препаратам первого ряда (рифампицин, изониазид, этамбутол) и к двум группам препаратов резервного ряда (фторхинолоны, инъекционные препараты).

Теоретическая значимость работы заключается в обоснованности подхода в выборе молекулярных мишеней для выявления генетических детерминант устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам резервного ряда в целях создания молекулярно-генетических диагностических методик, что позволило получить новые сведения о механизмах развития приобретённой лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*. Получены новые данные об уровне устойчивости возбудителя туберкулёза, заключающиеся в установлении спектра и частоты встречаемости мутаций, ассоциированных с высоким, низким и «промежуточным» уровнем резистентности к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам, существенно дополняют фенотипическую характеристику устойчивых *M.tuberculosis*. Экспериментально выявленные различия в степени устойчивости *M.tuberculosis* к основным препаратам первого и второго ряда позволили теоретически обосновать несоответствия в бактериологическом и молекулярно-генетическом определении лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Данные молекулярного изучения устойчивых штаммов *M.tuberculosis* на теоретической основе могут быть использованы для совершенствования микробиологической диагностики туберкулёза с применением современных молекулярно-генетических и бактериологических технологий для качественной и количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза

Практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что разработанный алгоритм комплексной лабораторной диагностики качественной и

количественной оценки лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза, с включением современных молекулярно-генетических технологий и бактериологических методов, повышает достоверность исследования лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза к антибактериальным препаратам, сокращает время получения результатов и служит основанием для назначения адекватной химиотерапии. С использованием разработанных молекулярно-генетических методик и секвенирования установлены клинически значимые типы мутаций и их сочетания в генах *gyrA/gyrB* и *rrs/eis*, приводящие к развитию устойчивости возбудителя туберкулёза к основным препаратам резервного ряда. Применение разработанных методик позволит расширить спектр анализируемых мутаций и повысить точность результатов определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину. Показано, что тестирование лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к моксифлоксацину при «критической концентрации» 0,25 мкг/мл в Bactec MGIT 960 позволяет увеличить корреляцию с молекулярно-генетическим определением чувствительности к препарату и получать адекватные результаты исследования. Полученные данные ассоциации мутаций со степенью устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину, изониазиду, этамбутолу и к двум группам препаратов резервного ряда (фторхинолоны, инъекционные препараты) более точно характеризуют устойчивость возбудителя по сравнению с результатами в Bactec MGIT 960 и дают возможность фтизиатрам своевременно внести коррективы в схему химиотерапии больных туберкулёзом. Обоснована диагностическая эффективность молекулярных технологий при исследовании операционного материала у больных без бактериовыделения для адекватного назначения химиотерапии в послеоперационный период.

Полученные при выполнении диссертации результаты исследования внедрены и применяются в Централизованной бактериологической лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы» (акт внедрения от 21.05.2021г.). Материалы диссертации вошли в курс лекций на кафедре фтизиатрии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России» (акт внедрения от 18.05.2021г.) и Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» (акт внедрения от 26.05.2021 г.).

Работа выполнена с применением современных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Представленные результаты являются достоверными, поскольку проведен достаточный объем исследований. Научные положения и выводы, сформулированные Носовой Е.Ю., 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 медицинских наук по специальностям: 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» на сайте [www.antiplagiat.ru](http://www.antiplagiat.ru) показал, что оригинальный текст составляет – 89,74%, самоцитирование – 7,49%, цитирование – 2,77%, заимствование – 0%.

Материалы исследования и основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на 15 российских и международных конференциях и конгрессах.

Диссертация не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 41 печатная работа, в том числе 21 статья в рецензируемых изданиях, 2 – методических рекомендаций и 4 патента на изобретение РФ.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01 (Д 208.046.01).

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

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

- Чернуха Марина Юрьевна - доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), руководитель Лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии».
- Мавзютов Айрат Радикович - доктор медицинских наук, профессор (03.02.03 – микробиология), заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет»
- Быков Анатолий Сергеевич - доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства Здравоохранения РФ.

Согласие официальных оппонентов имеется.

**Заключение:** комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01 (Д 208.046.01) рекомендует диссертацию Носовой Елены Юрьевны «Генетическая и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам. Методы и алгоритм диагностики» по специальностям: 1.5.11. – микробиология к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 (Д 208.046.01):

**Председатель:**

Ведущий научный сотрудник,  
Руководитель клинического отдела  
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
доктор медицинских наук

Н.И. Леонтьева

**Члены комиссии:**

Профессор кафедры микробиологии, вирусологии  
и иммунологии медико-профилактического факультета  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России (Сеченовский Университет),  
доктор медицинских наук, профессор

Ю.В. Несвижский

Профессор кафедры микробиологии, вирусологии  
педиатрического факультета  
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,  
доктор медицинских наук, профессор

Б.А. Ефимов

Главный научный сотрудник лаборатории клинической  
микробиологии и биотехнологии бактериофагов  
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
доктор биологических наук, профессор РАН

А.В. Алешкин

Управляющий директор УК Фармаклон  
доктор медицинских наук, профессор

А.В. Степанов