

Отзыв

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Григорьева Юрия Геннадьевича на диссертационную работу Бураковой Марины Владимировны на тему: «Эффективность химиотерапии туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, основанной на ускоренном определении рифампицина - резистентности» на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 14.01.16 – фтизиатрия.

1. Актуальность темы исследования

В Российской Федерации по-прежнему фиксируются недостаточно высокие показатели эффективности лечения туберкулеза, особенно среди больных с МЛУ возбудителя. Одним из факторов, обуславливающих низкую эффективность лечения, служит несвоевременное выявление лекарственной устойчивости МБТ в условиях продолжающегося роста числа случаев туберкулеза с МЛУ возбудителя.

По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в настоящее время в мире около 600 тысяч больных туберкулезом, выделяющих МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), при этом зарегистрировано только 125 тысяч случаев. Низкая эффективность лечения (52%) у данной группы больных в значительной мере обусловлена несвоевременным выявлением лекарственной устойчивости, и, как следствие, поздним началом использования рациональной химиотерапии, что ведет к развитию распространенных деструктивных изменений в легких, удлинению сроков прекращения бактериовыделения, хронизации процесса. Выявление лекарственной устойчивости традиционными культуральными методами на плотных средах занимает не менее 10-12 недель. Используемые в настоящее время молекулярно-генетические методы быстрого определения МЛУ возбудителя отвечают на поставленную задачу, но, к сожалению, не являются общедоступными, требуют особого оснащения лаборатории, дополнительного обучения персонала. В связи с этим актуальным представляется поиск новых нетрудоемких, доступных в использовании методов быстрого определения МЛУ МБТ, к которым можно отнести молекулярно-генетический картриджный метод. В основе каждый **молекулярно-генетический метод** содержит те или иные манипуляции с РНК и ДНК. Все данные **методы** отличаются огромной сложностью, без лабораторных условий проводиться не могут.

Складывающаяся ситуация диктует необходимость использования ускоренных методов диагностики ЛУ МБТ, одним из которых является картриджный метод. **Картриджная** технология GeneXpert MTB/RIF позволяет одновременно выявлять возбудителя и определять его чувствительность к рифампицину в течение 2 часов. Большое количество исследований подтвердило значимость этого метода в раннем выявлении туберкулеза и определении устойчивости МБТ к рифампицину, однако, его влияние на эффективность лечения остается мало изученным.

Данные о влиянии этой диагностической методики на эффективность лечения больных туберкулезом как в зарубежной, так и в отечественной литературе ограничены. Изучение роли этого метода в алгоритме обследования больных туберкулезом и его влиянии на эффективность лечения представляется актуальным.

Цель исследования

Повысить эффективность лечения больных туберкулезом легких с МЛУ возбудителя путем разработки тактики химиотерапии на основе ускоренной диагностики лекарственной устойчивости возбудителя к рифампицину с использованием картриджной тест-системы.

Для достижения намеченной цели были сформированы 6 задач.

2.Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Обоснованность и достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом наблюдений, использованием современных методик исследования, адекватных поставленным задачам и применением методов статистического анализа.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.16 - фтизиатрия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 2, 3 паспорта фтизиатрия (медицинские науки).

Для решения поставленных задач в исследование было включено 185 пациентов с туберкулезом легких. Все пациенты разделены на группы: 1 группа (76 человек) - пациенты, выделявшие МБТ с чувствительностью к рифампицину по данным картриджного метода, 2 группа (54 человека) - пациенты, выделявшие МБТ с резистентностью к рифампицину по данным картриджного метода.

3 группа (55 человек) составлена ретроспективно из пациентов, у которых картриджный метод не применялся для диагностики устойчивости МБТ к рифампицину. Тесты лекарственной чувствительности (ТЛЧ) проводились методом абсолютных концентраций. 1 группа исходно получала I режим химиотерапии, 2 группа — IV режим, коррекция терапии проводилась по результатам ТЛЧ по методу пропорций. 3 группе пациентов исходно назначен I режим химиотерапии с последующей коррекцией через 2-3 месяца.

Сравнительная эффективность лечения в группах оценивалась по критериям купирования интоксикационного синдрома, нормализации показателей гемограммы, прекращения бактериовыделения, заживления деструктивных изменений в легких.

Полученные результаты позволили создать научно-обоснованный подход к выбору химиотерапии туберкулеза легких на основании определения лекарственной чувствительности возбудителя к рифампицину. Разработан алгоритм назначения химиотерапии у больных туберкулезом легких в зависимости от результатов тестирования мокроты с помощью картриджной технологии и последующей коррекции на основании тестов лекарственной чувствительности по данным посева на жидких питательных средах.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Excel и BIOSTAT. Для оценки отличий показателей использовались вычисления с достоверностью 95% и выше, т.е. $p < 0,05$. Таким образом, использованные методики научного исследования и статистической обработки полученных результатов, а также объем клинических наблюдений достаточночен для получения достоверных результатов и свидетельствуют о репрезентативности полученных автором результатов и обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций.

3.Достоверность и новизна исследования.

Достоверность полученных в диссертационной работе результатов подтверждается достаточным объемом изученного материала — 185 больных туберкулезом легких, а также использованием современных методов статистической обработки полученной информации.

Апробация диссертации состоялась на расширенном заседании аprobационного совета. Основные положения диссертации доложены на Научно-практической конференции молодых ученых ФГБНУ ЦНИИТ, I и II конгрессе Национальной Ассоциации фтизиатров (2012, 2013), научной конференции ФГБНУ «ЦНИИТ» (2015, 2016). В конкурсе научно-исследовательских проектов молодых ученых практиков и студентов

«Туберкулез-минус: молодежные инновации XXI века» работа заняла II место (2014). Результаты исследования внедрены в процессе лечения больных в отделениях ФГБНУ «ЦНИИТ», в преподавании на курсах тематического усовершенствования врачей, ординаторов, аспирантов.

Научная новизна диссертационной работы

1. Впервые проведена сравнительная оценка эффективности химиотерапии у больных туберкулезом легких с лекарственной чувствительностью и рифампицином - резистентностью возбудителя, изначально основанной на результатах картриджного теста и посева на жидких средах.
2. Впервые показано влияние раннего определения ЛУ МБТ к рифампицину на эффективность лечения больных туберкулезом с МЛУ возбудителя. Показана частота совпадения рифампицина – резистентности и МЛУ МБТ. На основании проведенных доктором исследований, создан и внедрен комплекс организационных мероприятий по повышению эффективности выявления и лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких.
3. Установлено, что структура клинических форм туберкулеза легких у впервые выявленных больных не зависит от спектра лекарственной устойчивости возбудителя заболевания.
4. Доказано, что выявление лекарственной устойчивости к рифампицину служит индикатором множественной лекарственной устойчивости МБТ.
5. Определено, что использование картриджного метода для ускоренного определения рифампицина - резистентности МБТ позволяет назначить адекватную стартовую химиотерапию по 4 режиму в ранние сроки, и тем самым повысить эффективность лечения данной категории больных по клинико-лабораторным, микробиологическим, рентгенологическим показателям.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Полученные результаты позволили создать научно-обоснованный подход к выбору химиотерапии туберкулеза легких на основании определения лекарственной чувствительности возбудителя к рифампицину.
2. Разработан двухступенчатый алгоритм диагностики лекарственной устойчивости МБТ к препаратам первого и второго ряда у больных с различной исходной лекарственной чувствительностью возбудителя.
3. Разработан алгоритм назначения химиотерапии у больных туберкулезом легких в зависимости от результатов тестирования мокроты с помощью картриджной технологии и последующей коррекции на основании тестов лекарственной чувствительности по данным посева на жидких питательных средах.

Структура диссертации и краткая характеристика ее разделов.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, характеристики изученного материала и применяемых в работе методик, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Библиография содержит 174 источников (65 отечественных и 109 зарубежных). Собственно текст занимает 147 страниц машинописи, содержит 42 таблицы, иллюстрирована 21 рисунками, 7 клиническими примерами.

Выводы соответствуют задачам диссертации.

В введении докторант четко и убедительно доказывает актуальность исследования, формулирует цель и задачи, положения, выносимые на защиту, определяет научную новизну и практическую значимость работы, приводит сведения о внедрении результатов работы в практику.

Первая глава представляет собой аналитический обзор литературы по изучаемым вопросам.

Обзор посвящен анализу литературных источников в соответствии с поставленными

задачами исследования. Освещаются вопросы, связанные с выявлением, лечением и оценкой эпидемиологической обстановки. По мнению экспертов ВОЗ, сохраняющаяся напряженность эпидемиологической обстановки по туберкулезу в РФ, также как и в мире, связана с распространением МЛУ МБТ.

Проведенный анализ свидетельствует о хорошем знакомстве автора с отечественными и зарубежными литературными данными.

Во второй главе дается характеристика клинического материала и методов исследования, применявшимся в диссертационном исследовании в период с 2007 по 2013 гг.

Настоящая работа проводилась в ФГБНУ «Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза». Исследование носило проспективный характер. Для выполнения поставленных задач под наблюдение были взяты 185 взрослых ВИЧ - отрицательных пациентов, проходивших лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ» в 2007-2009 и 2012-2013 гг. по поводу туберкулеза легких, выделявших с мокротой ДНК микобактерий туберкулеза, имевших приверженность к лечению. Всем пациентам проводилось обследование по общему диагностическому минимуму, включавшему клинический, биохимический анализ крови, общий анализ мочи, исследование мокроты бактериоскопическим и бактериологическим методами с проведением тестов лекарственной чувствительности, рентгенологическое исследование органов грудной полости. У 130 пациентов 1 образец мокроты был тестирован с помощью картриджной системы «GeneXpert MTB/REF» для выявления ДНК МБТ и мутации в гене гроб, ответственной за формирование устойчивости к рифампицину. Батериовыделение выявлялось у 140 пациентов методом люминесцентной микроскопии (76%) и методом посева у 180 (97%). Микобактерии туберкулеза не были выявлены методом люминесцентной микроскопии у 45 больных (24%) и у 5 (3%) методом посева. Наиболее часто встречаемой формой туберкулеза была инфильтративная

Обоснованность и достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом наблюдений, использованием современных методик исследования, адекватных поставленным задачам и применением методов статистического анализа.

В третьей главе представлен анализ сравнительной оценки результатов микробиологических методов выявления микобактерий и определения лекарственной устойчивости.

В данной главе приведен анализ результатов обследования 130 пациентов, выделявших по крайней мере ДНК микобактерий туберкулеза, образец мокроты которых исследовался с помощью картриджной тест-системы и посева на жидкие питательные среды с последующей постановкой тестов лекарственной чувствительности.

130 пациентам было проведено однократное тестирование образца мокроты на анализаторе «GeneXpert MTB/RIF», по результатам которого все пациенты были разделены на 2 группы. 1 группу составили 76 больных, у которых не было обнаружено мутаций в гене гроб в ДНК микобактерий. 2 группу пациентов составили 54 человека, у которых, по результатам исследования мокроты картриджным методом, выявлена мутация в гене гроб, сопряженная с устойчивостью к рифампицину.

При анализе клинических форм туберкулеза в этих группах установлено, что преобладающей в 1 группе была инфильтративная (42,1%), реже встречались диссеминированная (18,4%), кавернозная (14,5%), фиброзно-кавернозная (11,8%) формы. Во 2 группе преобладающей формой явилась фиброзно-кавернозная (38,9%), реже регистрировались инфильтративная (24,1%), кавернозная (16,7%). Таким образом, частота встречаемости распространенных деструктивных форм туберкулеза была выше в группе 2, где число лиц, прошедших ранее неэффективный курс лечения (55,6%) преобладало над числом впервые выявленных больных (29,6%), по сравнению с группой 1, где большинство случаев относилось к впервые выявленным (72,4%).

Также и в отношении массивности бактериовыделения отмечалось некоторое преобладание в группе 2 по отношению к группе 1: обильное бактериовыделение методом люминесцентной микроскопии в 1 группе определялось у 20,4% больных, у 29,5% во 2 группе, методом посева 21,2 и 72,2% соответственно. Преобладание в группе 2 по сравнению с группой 1 пациентов с обильным бактериовыделением может объясняться превосходящим числом пациентов, ранее леченных неэффективно, в группе с мутациями в гене гров, имеющих более распространенные деструктивные процессы. Лекарственная чувствительность МБТ была сохранена ко всем препаратам у 58 (76,4%) пациентов 1 группы, монорезистентность отмечалась у 14(18,4%), из них к изониазиду - 7 (9,2%), полирезистентность регистрировалась у 2 больных, МЛУ МБТ выявлена в 2 случаях (2,6%). Таким образом, культуральный метод исследования для определения ЛЧ МБТ является необходимым дополнением к картриджному тесту, позволяющему выявлять устойчивость только к 1 препарату. Во 2 группе все 100% случаев устойчивости к рифампицину по данным картриджного метода были подтверждены методом посева, случаев сохранения чувствительности к изониазиду при устойчивости к рифампицину не выявлено, что позволяет сделать вывод о том, что выявление устойчивости к рифампицину служит маркером МЛУ МБТ.

Чувствительность картриджного метода по отношению к определению рифампицин-резистентности составила 96,4%, специфичность - 100%. Расчет диагностической эффективности метода показал 98,5% точность картриджного теста.

Четвертая глава посвящена оценке динамики клинико-лабораторных, микробиологических данных у больных туберкулезом легких, выделяющих МБТ с множественной лекарственной устойчивостью в зависимости от исходной тактики химиотерапии, сравнению темпов нормализации этих показателей с группой пациентов, выделяющих МБТ с сохраненной лекарственной чувствительностью.

При оценке спектра лекарственной устойчивости по методу посева на жидких питательных средах в группах с лекарственной устойчивостью МБТ было установлено, что МЛУ МБТ характеризуется многообразием: устойчивость к изониазиду, рифампицину сочеталась с устойчивостью к другим препаратам 1 -го ряда – в 55,5% и в 56,4% в основной и контрольной группах соответственно; к препаратам 1-го и 2-го ряда - 44,5% и в 43,6%. Устойчивость МБТ к аминогликозидам выявлялась у 11,1% и 14,5%, к фторхинолонам - в 13% и 11%, широкая лекарственная устойчивость - в 20,4% и 18,1% в основной и контрольной группах соответственно.

Эффективность проводимого лечения в группах оценивалась по критериям нормализации клинического состояния, показателей гемограммы, прекращение бактериовыделения методом люминесцентной микроскопии и посева.

Раннее назначение химиотерапии по результатам картриджного теста с последующей быстрой коррекцией по результатам посева на BACTEC MGIT 960 больным с МЛУ МБТ способствовало более быстрому регрессу клинических и лабораторных показателей, чем в группе, где адекватная химиотерапии проводилась в более поздние сроки по результатам посева на плотные питательные среды.

Прекращение бактериовыделения методом люминесцентной микроскопии и посева происходило наиболее быстро в группе 1, через 2 месяца лечения эти показатели составляли 72%. К 6 месяцам лечения у всех пациентов этой группы, являвшихся бактериовыделителями, произошло абациллизование мокроты обоими методами. Во 2 группе эти показатели были несколько ниже (64% и 52% через 2 месяца лечения), но к 6 месяцам терапии также у всех больных этой группы отмечалось абациллизование мокроты, в том числе методом посева. В 3 группе к 2 месяцам лечения процент абациллизирования мокроты микроскопически и культурально составил 17,0% и 5,5% соответственно, к 6 месяцам лечения у подавляющей части пациентов сохранялось бактериовыделение (51% по методу микроскопии и 63,6% по методу

посева). Таким образом, позднее назначение химиотерапии, соответствующей спектру лекарственной устойчивости МБТ способствует пролонгации периода нормализации клинико-лабораторных показателей, прекращения бактериовыделения.

Оценка впервые выявленных случаев заболевания в группах показала, что по клиническим формам среди впервые выявленных больных 1, 2 и 3 групп существенных различий выявлено не было ($p>0,1$), что позволяет судить о том, что исходный характер лекарственной устойчивости МБТ сам по себе не определяет тяжесть поражения легких. При раннем назначении персонифицированной химиотерапии прекращение бактериовыделения у впервые выявленных пациентов наступало в сопоставимые сроки у пациентов 1 и 2 групп, то есть в независимости от наличия или отсутствия лекарственной устойчивости возбудителя, опережая таковые сроки у пациентов в группе с отсроченной химиотерапией.

Глава 5 представляет динамику рентгенологических показателей у больных туберкулозом легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в зависимости от тактики химиотерапии

Данная глава посвящена оценке репаративных изменений в легких, по данным рентгенологического исследования, у больных туберкулезом, выделяющих МБТ с МЛУ в зависимости от сроков назначения химиотерапии, а также сравнительной оценке скорости инволютивных процессов в группе больных, выделяющих МБТ с сохраненной лекарственной чувствительностью.

Для оценки эффективности проводимого лечения всем 185 наблюдаемым пациентам было проведено рентгенологическое исследование органов грудной клетки на момент начала лечения и повторялось каждые 2 месяца.

В основу оценки рентгенологической динамики были положены скорость регрессии инфильтративных изменений и закрытие полостей деструкции. Лучшие темпы закрытия каверн отмечались в группе пациентов со случаями лекарственно-чувствительного,mono- и полирезистентного туберкулеза. Ниже эти показатели был и в группе МЛУ туберкулеза, где 4 режим химиотерапии назначался на основании картриджного теста с последующей ранней коррекцией по посеву на жидких питательных средах, что могло быть связано с более частой встречаемостью в данной группе фиброзно-кавернозных форм заболевания.

Самые скромные показатели отмечались в группе МЛУ туберкулеза, где назначение 4 режима химиотерапии проводилось в отсроченное время по результатам ТЛЧ на плотных питательных средах.

Распространенность поражения легких в 1 группе пациентов в равном количестве соответствовала 1-2 сегментам и 1-2 долям (по 45%), 10% пациентов имели поражение, распространяющееся на 3-5 долей. Во 2 и 3 группах, где преобладающее число пациентов имело поражение, соответствующее 1-2 долям (61,9 и 53% соответственно), большее число лиц, в сравнении с группой 1, имели распространенные процессы (3-5 долей), что составило во 2 группе 24,1% (13 человек) и 27% (15 человек) в 3 группе. И наименьшее число больных (8 во 2 группе (14,8%) и 11 в 3-й (20%)) имели ограниченные процессы в легких, занимавшие 1-2 сегмента. Таким образом, большая распространенность поражения легких отмечалась в группах, где преобладающее число пациентов уже имели в анамнезе эпизоды лечения по поводу туберкулеза. К 6 месяцам лечения наибольший процент закрытия деструкции был достигнут в группе 1 (71,4%), заживление деструкции не было достигнуто в группе больных, имеющих фиброзные каверны. В группе 2 этот показатель был на более низком уровне (49%), также преимущественно за счет фиброзных каверн, исходно эта часть пациентов была представлена более широко, чем в группе 1. Самый низкий показатель заживления фиксировался в группе 3 (34,7%), также низкий уровень в основном был обусловлен наличием фиброзных каверн, однако на другие виды сохранившихся деструкции

приходилось 20,4%. При оценке заживления всех деструкций, за исключением фиброзных каверн, установлено, что в 1 группе таких пациентов было 30 человек, заживление произошло в 100% случаев, во 2й группе у 23 из 25 (92%) и у 17 из 27 в 3 группе (63%). Таким образом, показано, что заживление деструкции в легких отмечалось быстрее в группе больных с МЛУ туберкулезом, режим химиотерапии которым назначался по результатам ускоренного определения рифамицино - резистентности с использованием картриджного теста, по сравнению с группой, коррекция химиотерапии которой проводилась по методу посева на плотных питательных средах. Среди категории впервые выявленных пациентов reparативные процессы в легких также происходили быстрее в группах с ранним назначением адекватной химиотерапии.

В отношении способа заживления деструктивных изменений также наилучшие результаты в виде заживления рубцом демонстрировала 1 группа (56,7%), несколько ниже показатель был в группе 2 (43,5%) и еще меньше в группе 3 (29,4%). Наименее благоприятный способ заживления (формирование туберкулемы), чаще отмечался в группе с отсроченным назначением персонифицированного лечения, в сравнении с группами, которые получали адекватную терапию исходно.

Средний срок стационарного лечения для пациентов с МЛУ возбудителя и ранним назначением терапии составил $7,2 \pm 3$ месяца, то есть было меньше, чем в аналогичной группе с отсроченным лечением (12 ± 2 месяцев).

Личный вклад автора в получении научных результатов.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах исследования, включая формирование рабочей гипотезы, постановку задач, получение исходных данных, апробацию результатов исследования, обработку и интерпретацию данных, подготовку публикаций по итогам работы. Автором проведен анализ литературы по изучаемой проблеме, разработан дизайн исследования, составлен протокол исследования, осуществлен набор и ведение пациентов, включенных в исследование, систематизированы полученные клинико-лабораторные, инструментальные показатели, результаты разных режимов терапии. Научные положения, выводы и практические рекомендации обоснованы, логичны и подтверждены фактами, полученными в результате работы. Буракова М.В. принимала активное участие в научно-практических конференциях, конгрессах, посвященных проблеме диагностики и лечения лекарственно-устойчивого туберкулоза. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Заключение отражает основные положения работы, изложенные в соответствующих главах диссертации, и содержит обсуждение полученных результатов

Выводы отражают существование работы и согласуются с поставленными задачами исследования. Практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнений.

Существенных замечаний, касающихся основных положений работы, избранных автором форм представления материала и оформления работы нет. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 работы в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобразования и науки России, 2 работы в иностранных изданиях. В автореферате в краткой форме полно изложены все основные положения работы.

Заключение

Диссертационное исследование Бураковой Марины Владимировны на тему: «Эффективность химиотерапии туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, основанной на ускоренном определении рифампицин - резистентности» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно - квалификационной работой.

В работе содержится решение актуальной научной задачи по совершенствованию химиотерапии туберкулеза легких с лекарственной устойчивостью возбудителя с использованием ускоренного метода определения рифампицин - резистентности МБТ.

Разработан научно-обоснованный подход к выбору химиотерапии туберкулеза легких на основании определения лекарственной чувствительности возбудителя к рифампицину с разработкой алгоритма назначения противотуберкулезных препаратов в зависимости от результатов тестирования мокроты с помощью картриджной технологии и последующей коррекции на основании тестов лекарственной чувствительности по данным посева на жидких питательных средах.

По актуальности, методическому уровню, научной новизне и практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям п. 9. «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.13 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.16 – фтизиатрия, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени.

Официальный оппонент

доктор медицинских наук, профессор
 ФГБОУ ВО «Московский государственный
 медико-стоматологический университет имени
 А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения
 Российской Федерации
 127473, г. Москва, Делегатская д.20/1
 8(903)609-67-00
 E-mail: msmsu@msmsu.ru

Ю.Г. Григорьев

21.02.2018г
 Подпись профессора Ю.Г. Григорьева - «заверяю»
 Ученый секретарь Ученого Совета
 ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»
 МЗ РФ доктор мед. наук, заслуженный врач РФ,
 профессор

Ю.А. Васюк

