

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Горбатова Алексея Александровича на тему «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы исследования

Туляремия относится к зоонозным инфекциям, природные очаги которой распространены, практически, на всех континентах Северного полушария. Возбудитель туляремии отличается высокой вирулентностью и контагиозностью, множественностью путей передачи и длительной выживаемостью во внешней среде. Заболевания людей регистрируются в виде спорадических случаев и эпидемических вспышек, происходящих в годы повышения численности грызунов.

В соответствии с регламентирующими документами лабораторная диагностика туляремии проводится бактериологическим методом (выделение чистой культуры туляремийного микроба и его идентификация) серологическими методами (кожная проба с тулярином, реакция лейкоцитолиза, РНГА, РА, МФА, ИФА) и с помощью наборов реагентов для выделения ДНК в ПЦР-анализе. Однако из-за сложности или длительности получения объективных результатов бактериологическим и биологическим методами, постановка диагноза туляремии, в большинстве случаев, основывается на полученных результатах серологических исследований.

С целью совершенствования диагностики туляремии иммунологическими методами активно ведется поиск белковых антигенов, которые могут использоваться при разработке новых препаратов. В последние годы в качестве перспективных антигенов для конструирования диагностических туляремийных препаратов рассматриваются белки FTT0077, FTT0106, FTT1696, FTT0472 и FTT0975.

В связи с этим работа Горбатова Алексея Александровича, направленная на изучение диагностического потенциала антигенов бактерий *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* и разработки на их основе иммунохроматографических тестов для ускоренной серодиагностики туляремии, является актуальной.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Большой объем исследований с применением комплекса современных методов позволил автору решить поставленные задачи и достичь цели, а также обосновать положения, выводы и рекомендации. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах.

Новизна результатов исследования не противоречит основным сведениям, полученным другими исследователями. Степень достоверности полученных данных основана на использовании большого фактического материала, с использованием современных высокоинформативных методов. Достоверность результатов, подтвержденная приведенными таблицами и рисунками, а также

статистической обработкой, не вызывает сомнения и показывает правильность выбора методических подходов.

Степень новизны, обоснованности научных исследований, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Горбатова А.А. является законченной научно-квалификационной работой, в которой создан новый рекомбинантный штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинатного белка FTT1696 *Francisella tularensis*, клонированного в составе вектора pET32b; установлена его специфичность для штаммов *F. tularensis* различных подвидов и определена диагностическая значимость для разработки иммунохроматографических тестов. Показано, что чувствительность и специфичность иммунохроматографических тестов значительно повышается при использовании комплекса антигенов липополисахарида (ЛПС) *F. tularensis*, ЛПС *F. novicida* и рекомбинантного белка FTT1696.

С использованием электронной микроскопии получены новые данные о соотношении гидрофильной и гидрофобной частей в препаратах ЛПС коррелирующих с толщиной капсульного вещества для каждого штамма *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*.

В ходе проведенных экспериментов доказано, что использование иммунологических тестов на основе ЛПС *F. tularensis* и *F. novicida* позволяет дифференцировать гуморальный ответ вакцинированных и переболевших туляремией людей.

Научной новизне отвечают данные, полученные при экспериментальной туляремии у мышей линии BALB/c, свидетельствующие о формировании гуморального иммунного ответа, отличающегося от иммунологических реакций, развивающихся в организме других лабораторных животных (морские свинки, кролики и крысы) сниженным уровнем титров специфических антител к ЛПС *F. tularensis* и отсутствием антител к ЛПС *F. novicida*.

Предложенные Горбатовым А. А. иммунохроматографические тесты на основе антигенов ЛПС *F. tularensis*, ЛПС *F. novicida* и рекомбинантного белка FTT1696 позволяют повысить чувствительность и специфичность серодиагностики туляремии.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Работа имеет большое теоретическое значение и актуальна для практического здравоохранения. Результатом проведенных экспериментов явилась предложенная автором гипотеза, проливающая свет на обнаружение серопозитивных сывороток у людей и животных, инфицированных вирулентными штаммами *F. tularensis*, в отношении липополисахарида *F. novicida*, и отсутствия антител в сыворотках людей, вакцинированных туляремийной вакциной. Механизм развития данного явления, по мнению автора, объясняется большим количеством капсульного О-антигена у вирулентных штаммов по сравнению с вакцинным штаммом, что приводит к индукции антител, распознающих общие для подвидов *F. tularensis* и *F. novicida* эпитопы соответствующих липополисахаридов.

Показана целесообразность комплексного использования препаратов антигенов ЛПС *F. tularensis*, *F. novicida* и рекомбинантного белка FTT1696 для серологической диагностики туляремии и оценки иммунного статуса у переболевших и вакцинированных людей.

В «Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов-Оболенск» депонирован высокопродуктивный штамм-продуцент *E. coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинантного белка FTT1696 (справка № В8363 от 29.01.2018 г.).

Разработаны и апробированы для комплексной серодиагностики туляремии у людей и животных иммунохроматографические тест-системы на основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, для обнаружения специфических антител к туляреминому микробу с комплексом антигенов ЛПС *F. tularensis*, *F. novicida* и рекомбинантным белком FTT1696.

Разработаны и внедрены в практическую работу лабораторий ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора методические рекомендации:

- «Оценка напряженности специфического клеточного иммунитета у людей к возбудителю туляремии *in vitro*» (утверждены директором, протокол Ученого совета № 8 от 07.10.2011 г.);

- «Методика оценки напряженности специфического иммунитета к туляремии на мышинной модели при иммунизации потенциальными вакцинными штаммами» (утверждены директором, протокол Ученого совета № 8 от 29.10.2015 г.).

Разработано практическое пособие «Методы изучения возбудителя туляремии» (Под ред. академика РАН И.А.Дятлова. Авторы: А.Н. Мокриевич, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Г.М. Вахрамеева, А.А. Горбатов, И.А. Дятлов, Т.И. Комбарова, П.Х. Копылов, Т.Ю. Кудрявцева, Л.И. Маринин, Р.И. Миронова, А.Н. Сомов, В.С. Тимофеев, Е.А. Тюрин, В.В. Фирстова, Р.З. Шайхутдинова, Н.А. Шишкова. - Оболенск.: ФБУН ГНЦ ПМБ, 2018).

Результаты исследования используются:

- в Центре индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противэпидемической готовности при ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора для исследования сывороток вакцинированных и переболевших туляремией людей, а также сывороток экспериментальных животных для выявления специфических антител к возбудителю туляремии (акт внедрения от 17.01.2018);

- в Испытательном лабораторном центре противочумной станции в ФГУЗ «Медико-санитарная часть № 164» для выявления специфических антител в сыворотках людей, вакцинированных туляреминой вакциной (акт внедрения от 14.02.2018);

- в ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора для выявления специфических антител в сыворотках людей, вакцинированных туляреминой вакциной (акт внедрения от 10.02.2018).

Структура и содержание диссертации, ее завершенность

Основной текст диссертации изложен на 183 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, заключения, выводов,

практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 294 работы, из них 74 работы отечественных и 220 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 17 таблицами.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационной работы были представлены, на 3 международных и Всероссийской конференциях: 1-ой Международной конференции по инфекционным заболеваниям и наномедицине (Непал, Катманду, 2012); Международном симпозиуме по опасным заболеваниям (Австрия, Вена, 2014); Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Россия, Сочи, 2015); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные заболевания» (Россия, Сочи, 2017).

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции ФБУН ГНЦ ПМБ (протокол № 52 от 28 марта 2018 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 4 статьи в ведущих рецензируемых изданиях, 2 тезисов - в рецензируемых изданиях, 3 – в других изданиях, 6 – в материалах конференций.

Содержание диссертации, ее завершенность

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований; приведены научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Семь поставленных задач соответствуют цели работы и положениям, выносимым на защиту.

В разделе «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых были решены поставленные задачи. Необходимо отметить высокий уровень методических подходов с использованием микробиологических, биохимических, биологических, иммунологических, молекулярно-генетических, статистических методов, а также электронно-микроскопических и биоинформационных исследований. В работе использовались 15 штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*, в том числе 2 экспериментальных штамма, а также *Legionella pneumophila*, *Brucella abortus* и три экспериментальных штамма *E. coli*. Материалами для исследований служили сыворотки, полученные от людей больных или переболевших с установленным диагнозом туляремии и вакцинированных, а также от экспериментальных животных; кроличья сыворотка к белку FTT1696; коммерческий препарат Тулярин.

Объем фактического материала является достаточным для проведения статистической обработки результатов.

В литературном обзоре (Глава I) обстоятельно освещены основные сведения о возбудителе туляремии, поверхностных структурах и иммунодоминантных антигенах *F. tularensis*; проанализированы литературные источники, касающиеся современной эпидемиологической обстановки и лабораторной диагностики

туляремии в Российской Федерации. Проведенный анализ литературных данных выявил необходимость совершенствования серологической диагностики туляремии, направленной на разработку новых чувствительных препаратов, позволяющих сократить сроки постановки диагноза с высокой достоверностью результатов. Представленный обзор литературы, основанный на использовании большого объема научных статей, характеризует автора как эрудированного специалиста, знающего современную научную литературу, свидетельствует об актуальности темы работы и позволил соискателю обосновать необходимость научного подхода для решения поставленных задач.

Глава заканчивается подведением итогов проделанной работы в виде краткого Заключение и дальнейшего перехода к изложению собственных исследований. Результаты собственных исследований изложены в главах со второй по четвертую.

В главе 2 «Липополисахарид туляремийного микроба – уникальный антигенный компонент клеточной стенки» представлены результаты изучения липополисахаридов клеточной стенки *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*). Проведенный сравнительный анализ показал, что использование окрашивания ионами серебра, не позволяет выявлять спектр структур О-антигена различных подвидов туляремийного микроба с различным молекулярным весом из-за их слабой выявляемости на электрофореграммах. При этом препараты всех образцов ЛПС *F. tularensis* различных подвидов имели схожие электрофореграммы.

Определение иммунологически активных структур в молекуле ЛПС *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) проводили в реакции иммуноблотинга и дот-блота с сыворотками крыс линии Wistar, которым вводили штаммами различных подвидов *F. tularensis* - *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*. В ходе проведения экспериментов выявлено наличие специфических антител к ЛПС *F. tularensis* и к ЛПС *F. novicida* при заражении вирулентными штаммами и отсутствие антител к ЛПС *F. novicida* при вакцинальном процессе.

Полученные результаты электронной микроскопии и анализа продуктов мягкого кислотного гидролиза ЛПС исследуемых штаммов показали, что определение соотношения гидрофильной (углеводная) и гидрофобной (ЛПС) части бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов по определению толщины капсульной составляющей клеточной стенки может служить критерием оценки вирулентности для некоторых подвидов (*tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*).

В главе 3 «Белок GroEL FTT1696 – иммунодиагностически значимый антиген туляремийного микроба» проведены исследования, которые позволили выявить наиболее иммунореактивные антигены *F. tularensis* белковой природы; клонировать, получить и охарактеризовать иммунобиологическую активность белка FTT1696 *F. tularensis*. Основываясь на результатах проведенных исследований, автор показал, что высокая специфичность белка FTT1696 позволяет рассматривать его в качестве перспективного антигена для

диагностических целей, в том числе как дополнительный антиген при диагностике спорадических случаев туляремии в острой фазе заболевания.

В главе 4 «Диагностическая значимость антигенов *Francisella ssp.* для изучения иммунитета при поствакцинальном и постинфекционном процессе у людей и лабораторных животных» представлены данные изучения клеточного иммунитета мышей линии BALB/c(H2^d), иммунизированных различными антигенами (ультразвуковой дезинтегра́т (УЗД), тулярин, кислотонерастворимый комплекс (КНК), ЛПС Ft, рекомбинантный белок FTT1696); гуморального иммунитета по определению специфических антител в сыворотках людей, переболевших туляремией или вакцинированных туляремийной вакциной, с использованием УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ, ЛПС Ft *F. tularensis* 15 НИИЭГ, ЛПС Fn *F. novicida*, рекомбинантный белок FTT1696 *F. tularensis*.

Установлено, что в качестве антигенов при оценке напряженности клеточного иммунитета по уровню индуцированного гамма-интерферона при туляремии могут быть использованы комплексные антигены *F. tularensis* УЗД, КПК и Тулярин. Для оценки гуморального иммунитета целесообразно использовать в качестве антигенов специфические ЛПС *F. tularensis* в иммуноферментном или иммунохроматографическом исследованиях.

Помимо этого, были проведены исследования по изучению гуморального иммунитета восприимчивых и высокочувствительных животных (мыши линии BALB/c и морские свинки) при иммунизации и заражении вирулентными штаммами разных подвидов, а также восприимчивых и малочувствительных животных (кролики породы Шиншилла и крысы линии Wistar).

Анализ данных, полученных при исследовании сывороток людей, переболевших туляремией и вакцинированных, а также сывороток лабораторных животных, позволил автору сделать заключение о том, что обнаружение антител к ЛПС *F. novicida* можно использовать для дифференциации инфекционного и поствакцинального иммунитетов. Обнаружение в сыворотке крови антител к высокоспецифичному белку *F. tularensis* FTT1696 предложено применять для постановки диагноза туляремии.

Логическим завершение работы (глава 5) явилась разработка и апробация иммунохроматографических тестов с предложенными антигенами туляремийного микроба для экспрессной серодиагностики туляремии. Автор в своей работе убедительно продемонстрировал высокую диагностическую ценность разработанных иммунохроматографических тестов при выявлении специфических антител в сыворотках людей, вакцинированных туляремийной вакциной и переболевших туляремией, а также в сыворотках лабораторных животных, вакцинированных и инфицированных вирулентными штаммами различных подвидов (*holarctica*, *mediasiatica*, *tularensis*). В дальнейшем разработанные Горбатовым А.А. иммунохроматографические тесты с ЛПС Ft можно рекомендовать в качестве иммунохроматографических тест-систем к регистрации в установленном порядке для диагностики туляремии при мониторинговых серологических исследованиях вакцинированных людей и для оценки эпидемиологической обстановки в природных очагах.

В заключение диссертационной работы обобщены собственные данные, отражена новизна, теоретическая и практическая. Завершающим этапом работы явилась разработка и апробация высокочувствительных и специфичных иммунохроматографических тестов с изученными антигенами ЛПС Ft, ЛПС Fn и рекомбинантного белка FTT1696 для ускоренной серодиагностики туляремии, что будет способствовать своевременному проведению мониторинга в природных очагах туляремии и организации профилактических мероприятий.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Основные результаты диссертационной работы получены при личном участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями. Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических и статистических исследованиях, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

В автореферате диссертационной работы Горбатова А.А. представлены положения, выносимые на защиту, выводы, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимости, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Диссертационная работа производит положительное впечатление. Принципиальных замечаний по работе нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, технических опечаток, не оказывают влияние на высокую положительную оценку работы.

Вместе с тем к Алексею Александровичу имеются вопросы:

1. В инструкции по применению на иммунохроматографическую тест-систему необходимо указывать, что принимается за диагностический титр. По результатам Ваших исследований, какой титр антител следует принимать за диагностический у больных/переболевших или вакцинированных живой туляремийной вакциной людей, или значения равнозначны?

2. Одним из Ваших предложений является проведение мониторинга в природных очагах туляремии с помощью разработанного Вами метода. В чем будет заключаться работа, и какие организационные мероприятия будут проводиться по мониторингу природных очагов (грызуны)?

3. Риторический вопрос: планируется регистрация иммунохроматографической тест-системы в установленном порядке в Российской Федерации, какие документы и материалы подготовлены?

Заключение

Диссертационная работа Горбатова Алексея Александровича на тему «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии», является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором получены новые сведения о липополисахаридах

F. tularensis различных подвигов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*); получен белок FTT1696 *F. tularensis* и охарактеризована его иммунобиологическая активность; разработаны иммунохроматографические тесты на основе ЛПС Ft, ЛПС Fn и белка FTT1696 для диагностики туляремии и оценки постинфекционного и вакцинального иммунитетов в сыворотках крови людей и экспериментальных животных, имеющих важное научно-практическое значение для микробиологии особо опасных инфекций. По актуальности, объему, новизне, и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Горбатова Алексея Александровича на тему «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии» соответствует требованиям п. 9. Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Горбатов Алексей Александрович, заслуживает присуждению ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 микробиология.

Официальный оппонент
 Главный эксперт
 Федерального государственного
 бюджетного учреждения «Научный центр
 экспертизы средств медицинского
 применения»
 Минздрава России
 доктор медицинских наук,
 старший научный сотрудник

Саяпина Лидия Васильевна

Юридический адрес:
 127051, г. Москва,
 Петровский бульвар, д.8, строение 2
 Тел: 499-241-91-47,
 E-mail: Sayapina@expmed.ru

Подпись доктора медицинских наук
 Саяпиной Лидии Васильевны удостоверяю:

Начальник отдела
 подготовки кадров
 Федерального государственного
 бюджетного учреждения «Научный центр
 экспертизы средств медицинского применения»
 Минздрава России

14 мая 2019 г.



Макаров Алексей Владимирович