

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Минздрава России

академик РАН

А. Л. Гинцбург

«16» 05 2019 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертационной работы Горбатова Алексея Александровича «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Туляремия – острое инфекционное заболевание зоонозной природы, токсико-аллергического, реже септического характера. Возбудителем этого заболевания является грамотрицательная коккобактерия *Francisella tularensis*, которая относится к особо опасным микроорганизмам. Природные очаги туляремии представляют собой устойчивые паразитарные системы. Они характеризуются длительным существованием, что обуславливает эпизоотический и эпидемический потенциал многие годы. Туляремия – острое инфекционное заболевание с многообразием путей и механизмов передачи возбудителя, полиморфизмом клинических проявлений и склонностью к затяжному течению. Тяжесть заболевания обусловлена высокой патогенностью возбудителя *F. tularensis*. В настоящее время в пределах этого вида *F. tularensis* выделяются четыре подвида (subsp.): *tularensis*, *mediasiatica*, *holarctica* и *novicida*, которые различаются по комплексу фенотипических, генетических и экологических особенностей, а также по ареалу распространения. Среди них наибольшей вирулентностью для человека обладают штаммы подвида *tularensis*, а *F. tularensis* subsp. *novicida* считают условно патогенным для человека, так как единичные случаи выделения этого подвида отмечены у лиц со сниженным иммунным статусом.

Возбудитель туляремии является одним из наиболее инфекционных микроорганизмов. 10-50 бактерий приводят к развитию инфекционного процесса у человека. Высокая восприимчивость и патогенность для человека, особенно при аэрозольном заражении возбудителем подвида *tularensis*, а также значительная летальность при отсутствии мер противодействия стала основанием для включения *F. tularensis* в число наиболее опасных возбудителей – потенциальных агентов биологического оружия и биотерроризма.

В соответствии с действующими методическими указаниями (МУ 3.12007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией») используют иммунологический (сероаллергическая диагностика), биологический и бактериологический методы. В большинстве медицинских учреждений отсутствует разрешение на проведение работ с бактериальными агентами I-II групп биологической активности, поэтому молекулярно-генетические методы и выделение чистой культуры из клинического материала не представляются возможными. В связи с этим остается серологический метод, выявляющий наличие специфических антител к возбудителю в сыворотках пациентов как для постановки предварительного диагноза, так и оценки напряженности поствакцинального иммунитета, а также для проведения эпидемиологического мониторинга в эндемичных районах. Для проведения иммунологических исследований требуется от 3 до 18 часов и специализированное оборудование. В РФ зарегистрирован один коммерческий туляремийный серодиагностикум - "РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ", производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института для выявления антитуляремийных антител. Однако при использовании этого метода (РНГА) могут обнаруживаться некоторые перекрестные реакции (например, с бруцеллезными сыворотками). Кроме того, используемые иммунологические методы недостаточно чувствительны.

Таким образом, тема диссертационной работы Алексея Александровича Горбатова, посвященной совершенствованию серологических методов диагностики туляремии, следует признать безусловно актуальной.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основу научной новизны результатов, полученных А.А. Горбатовым, составляет конструирование штамма-продуцента *E. coli* BL21/pETFTT1696 для экспрессии рекомбинатного белка FTT1696 *F. tularensis*, клонированного в составе вектора pET32b (Novagen USA).

Впервые установлена специфичность белкового антигена FTT1696 для штаммов *F. tularensis* разных подвидов и показана его диагностическая значимость, что позволяет использовать рекомбинантный белок FTT1696 с целью создания иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии.

Получены новые данные методом электронной микроскопии о том, что соотношение гидрофильной и гидрофобной частей в препаратах липополисахаридов штаммов *F. tularensis* различных подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* коррелирует с толщиной слоя капсульного вещества туляремийного микроба.

Приведены убедительные доказательства на статистически значимом количестве экспериментальных животных (морские свинки, кролики и крысы), что использование иммунологических тестов на основе липополисахаридов *F. tularensis* и *F. novicida* позволяет дифференцировать гуморальный ответ вакцинированных и переболевших.

Выявлено, что при экспериментальной туляремии у мышей линии BALB/c, в отличие от других лабораторных животных (морских свинок, кроликов и крыс), формируется иной тип гуморального иммунного ответа, выражающийся в сниженном уровне титров специфических антител к липополисахариду *F. tularensis* и в отсутствии антител к липополисахариду *F. novicida*.

Впервые показано, что совместное использование трех антигенов: липополисахарида *F. tularensis*, липополисахарида *F. novicida* и рекомбинантного белка FTT1696 в составе иммунохроматографических тестов повышает чувствительность и специфичность серодиагностики.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа А.А. Горбатова выполнена на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках научно-исследовательской работы № 48 «Изучение механизмов патогенеза и иммуногенеза туляремийной инфекции и мониторинг за циркуляцией возбудителя в отдельных регионах Российской Федерации».

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Автором диссертационной работы предложена научная гипотеза, объясняющая феномен серопозитивности сывороток людей и животных, инфицированных вирулентными штаммами *F. tularensis*, в отношении липополисахарида *F. novicida*, отсутствующей в сыворотках вакцинированных.

Впервые автором показано, что для оценки напряженности клеточного иммунитета можно использовать сочетание антигенов туляремийного микроба – тулярин,

ультразвуковой дезинтеграции и кислотонерастворимый комплекс – в качестве специфических индукторов иммунокомпетентных клеток.

Автором получены новые данные о существенных отличиях параметров гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c при экспериментальной туляремии по сравнению с лабораторными животными других видов.

Сконструирован высокопродуктивный штамм-продуцент *E.coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинантного белка FTT1696 (депонирован в «Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов - Оболенск» - 29.01.2018 г).

Практическая ценность рекомбинантного белка FTT1696, предложенного автором, определяется возможностью использовать его в качестве дополнительного антигена для серодиагностики туляремии, начиная с острой фазы заболевания.

Разработаны и апробированы универсальные иммунохроматографические тесты на основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, для обнаружения специфических антител к тулярийному микробу с тремя антигенами – тулярийными липополисахаридами *F. tularensis*, *F. novicida* и рекомбинантным белком FTT1696 – для комплексной серодиагностики туляремии у людей и животных.

Достоверность результатов исследования не вызывает сомнения. Диссертация основана на большом объеме материала, общенаучных и специфических методах. В работе использованы общепринятые методы исследования, в том числе микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические, иммунологические, электронно-микроскопические, биоинформационные и статистические.

На основе результатов, полученных автором, были разработаны и внедрены в практическую работу лабораторий ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) следующие методические рекомендации: «Оценка напряженности специфического клеточного иммунитета у людей к возбудителю туляремии *in vitro*» (07.10.2011 г.); «Методика оценки напряженности специфического иммунитета к туляремии на мышинной модели при иммунизации потенциальными вакцинными штаммами» (29.10.2015 г.). Материалы диссертации отражены в практическом пособии «Методы изучения возбудителя туляремии» (Оболенск: ФБУН ГНЦ ПМБ, 2018).

Практическое использование полученных автором результатов осуществляется в Центре индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности при ФБУН ГНЦ ПМБ (акт внедрения от 17.01.2018). Материалы диссертации Горбатова А.А. также используются в работе испытательного лабораторного центра противочумной станции в ФГБУЗ МСЧ № 164» ФМБА России ФБУН ГНЦ ПМБ (акт внедрения от 14.02.2018), ФКУЗ «Ростовский-на-

Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (акт внедрения от 10.02.2018).

Диссертантом 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.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Предложенные методы могут быть рекомендованы для внедрения в практику разработанного и апробированного автором иммуноферментного анализа (с использованием очищенного препарата липополисахарида *F. tularensis* в качестве адсорбированного антигена) для оценки гуморального иммунитета при туляремии. Иммунохроматографическую тест-систему с липополисахаридом *F. tularensis* также можно рекомендовать для диагностики туляремии, мониторинговых серологических исследований вакцинированных людей и оценки эпидемиологической обстановки в природных очагах. Это позволит заменить рутинные агглютинационные тесты на более простые (в ускоренном варианте) и не требующие высокой квалификации персонала.

Полученные автором результаты должны быть внедрены в повседневную практическую деятельность специализированных лабораторий, осуществляющих диагностику туляремии.

Результаты диссертационного исследования Горбатова А.А. могут быть использованы в преподавании курсов микробиологии и инфектологии при чтении лекций о туляремии в медицинских ВУЗах и учебных программах последипломного дополнительного образования для врачей-бактериологов.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 03.02.03 –микробиология.

Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает, как и опубликованные автором работы, содержание диссертационной работы.


Результаты исследования Горбатова А.А. обсуждены и одобрены на научной конференции отдела природноочаговых инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 2/19 от 22.04.2019 г.).

Заключение

Диссертационная работа Горбатова Алексея Александровича «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по

специальности 03.02.03 – микробиология, выполненная под руководством доктора биологических наук Фирстовой Виктории Валерьевны и кандидата биологических наук Бикетова Сергея Федоровича, содержит новое решение актуальной научной задачи – совершенствование и апробация серологических методов диагностики туляремии и, в том числе, дифференциации иммунного ответа вакцинированных и переболевших людей, что имеет важное значение для микробиологии.

По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Горбатова Алексея Александровича «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии» отвечает 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 учёной степени кандидата медицинских наук, а её автор Горбатов Алексей Александрович заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Старший научный сотрудник лаборатории туляремии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат биологических наук 

Кормилицына Марина Ильинична

Москва 123098 ул. Гамалеи д.18. Телефон: +7 (499) 193-73-51;

адрес электронной почты: mkormilits@mail.ru

Подпись Кормилицыной Марины Ильиничны заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидат биологических наук



Кожевникова Людмила Кондратьевна