

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Мокриевича Александра Николаевича «Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 03.02.03 – микробиология, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность темы. Широкая распространенность туляремии, в том числе на территории Российской Федерации, и периодическое возникновение вспышек этого заболевания диктуют необходимость глубокого генетического изучения выделенных штаммов *Francisella tularensis* не только в пределах вида и подвида, но и определенного генетического кластера, что исключительно важно в свете требований современного здравоохранения и реальной угрозы биотерроризма. Знание исторических и территориальных особенностей распространения штаммов *F.tularensis* является залогом успеха при эпидемиологическом расследовании случаев заболеваний, установлении источника и прогнозировании путей распространения инфекции. При этом очень значима информативность использованных для филогенетического анализа VNTR локусов при MLVA-типировании.

Будучи зоонозной природно-очаговой особо опасной инфекцией, туляремия характеризуется высокой летальностью для человека при отсутствии лечения, что обуславливает необходимость вакцинации населения в эндемичных районах и в группах риска. Однако живые вакцины, формирующие напряженный иммунитет, обладают высокой реактогенностью, что ограничивает их использование для детей и людей с ослабленным иммунитетом. Поэтому конструирование новых туляремийных вакцин путем создания штаммов с целенаправленно модифицированными генами-мишенями является крайне важным элементом в решении этой проблемы.

Поставленные и выполненные А.Н.Мокриевичем задачи исследования в полной мере раскрывают цель диссертационной работы.

Научная новизна. Впервые с помощью полногеномного секвенирования определена нуклеотидная последовательность генома штамма алтайского геноварианта *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, которая депонирована в GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA244815>).

Установлено, что инактивацию гена *recA* системы рекомбинации *F. tularensis* можно использовать для стабилизации наследуемых свойств при создании новых вакцинных штаммов. Вместе с тем показано, что инактивация одной копии гена *iglC* и гена *recA* в геноме вакцинного штамма снижает его реактогенные свойства, сохраняя при этом иммуногенность.

Обнаружено, что лактамазы Bla1 и Bla3 являются функционально неактивными по отношению ко всем группам используемых в клинической практике β -лактамов, а устойчивость к ним обеспечивает только сериновая β -лактамаза Bla2, что может быть использовано для генно-инженерных работ с использованием плазмид, несущих маркеры устойчивости к β -лактамам. В целом, разработана методология конструирования штаммов с заданными свойствами.

Практическое значение работы состоит в описании эволюционной модели появления и распространения среднеазиатского подвида туляремийного микроба, циркулирующего на территории Южной Сибири (Алтайский край). Автором разработан и рекомендован к применению способ одновременной регистрации ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени; предложен метод ПЦР с одним праймером для проведения дифференциации штаммов *F. tularensis*, принадлежащих к различным подвидам.

В результате проведенной работы разработан и успешно апробирован алгоритм отбора потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis* путем целенаправленной модификации генов с целью уменьшения их реактогенности.

Автором определен минимальный набор из 17 VNTR-локусов, позволяющий достоверно проводить внутривидовую кластеризацию штаммов *F. tularensis*.

Результаты проведенных исследований нашли отражение в ряде нормативно-методических документов: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2642-10 «Профилактика туляремии»; Методические указания МУК 4.2.2939-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней»; Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (под ред. Г.Г. Онищенко и В.В. Кутырева, изд. 2-е, перераб. и доп., 2013 г.).

Разработаны и внедрены в практику методические рекомендации: «Сайт-направленный мутагенез генома туляремийного микроба» (2003 г.), «Создание авирулентных штаммов *Francisella tularensis* голарктической расы в качестве потенциальных антитуляремийных вакцинных штаммов (2003 г.), «Создание модифицированных штаммов туляремийного микроба, перспективных для разработки современной живой вакцины» (2009 г.), «Индикация возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени» (2011 г.), «Проведение работ по характеристике изолятов *Francisella tularensis*» (2013 г.), «Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК) антибиотиков для *F. tularensis* колориметрическим методом» (2015 г.), «Методика оценки напряженности иммунитета к туляремии на мышинной модели при иммунизации потенциальными вакцинными штаммами» (2015 г.).

Методология и методы исследования. Объектами исследования являлись штаммы *F. tularensis* из коллекции «ГКПМ-Оболенск», выделенные природные изоляты, созданные генетически модифицированные штаммы на основе вакцинного штамма. Всего изучено 159 штаммов *F. tularensis*. Моделирование инфекции проводили на мышах линии BALB/c. Для оценки внутриклеточного размножения штаммов *F. tularensis* была использована перевиваемая макрофагоподобная клеточная линия J774.1A и перитонеальные макрофаги, полученные от мышей линии BALB/c. Для изучения иммуногенеза

при экспериментальной туляремии мышей использовали пробы крови и спленоциты мышей линии BALB/c.

В работе применяли молекулярно-генетические, микробиологические, биохимические, гематологические, гистологические, иммунологические методы исследований. Многочисленные данные исследований подвергнуты адекватному статистическому анализу.

Достоверность исследований обеспечивается хорошей методической базой и адекватностью примененных современных методов исследования и математического моделирования.

По теме диссертации автор имеет 82 научные работы, в том числе 22 статьи в рецензируемых изданиях, 60 – в материалах конференций, одно руководство, 5 патентов на изобретения РФ.

Автореферат написан в хорошем научном стиле, отличается четкостью и подробностью. Выводы вытекают из результатов исследования и соответствуют поставленным задачам.

Ознакомление с работами автора, опубликованными в печати, и рецензирование автореферата, позволяют сделать **закключение**: диссертационная работа Мокриевича Александра Николаевича «Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена крупная научная проблема: разработана современная методология диагностики и профилактики туляремии путем усовершенствованной лабораторной индикации и идентификации *F. tularensis*, а также усовершенствованы молекулярно-генетические подходы для создания улучшенных вакцинных препаратов.

По актуальности, новизне полученных данных, внедрению результатов исследований, диссертационная работа Мокриевича Александра Николаевича соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской

Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а ее автор, Мокриевич Александр Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 03.02.03 – микробиология, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Профессор кафедры микробиологии,
доктор медицинских наук, доцент
Военно-медицинской академии
имени С.М. Кирова Министерства обороны
Российской Федерации

Л.А.Краева

21 октября 2016 г.

194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6
тел. 8 (812) 329-71-69, тел. моб. +7 (904) 610-21-54
e-mail: lykraeva@yandex.ru

Подпись Людмилы Александровны Краевой заверяю:

Начальник отдела кадров



Д.Е.Гусев