

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного бюджетного
учреждения «Федеральный научно-исследовательский
центр эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
доктор биологических наук, профессор, академик РАН
А.Д. Гинцбург.



«21» октября 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущего учреждения Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертационной работы **Мокриевича Александра Николаевича** «Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология, представленной к защите в диссертационный совет Д208.046.01 в 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

Актуальность темы выполненной работы:

В настоящее время туляремия остается одной из серьезных и актуальных проблем здравоохранения, занимая существенное место в структуре инфекционной патологии человека.

Разработка и использование в России высокоэффективной живой вакцины против туляремии создали реальную возможность для резкого снижения заболеваемости в стране до уровня спорадических случаев и небольших вспышек, поэтому начиная с 1965 года туляремия относится к инфекциям, контролируемым с помощью средств вакцинопрофилактики. Широкая распространенность возбудителя туляремии в природе, высокая инфекционность для человека, трудности эффективной терапии, легкость распространения возбудителя во внешней среде обуславливают необходимость вакцинации населения в эндемичных районах и в группах риска. В настоящий момент эффективную защиту против туляремии обеспечивают живые вакцины – *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS, которые способны формировать напряженный иммунитет, однако относительно высокая реактогенность ограничивает их применение для лиц с ослабленным иммунитетом, что обосновывает необходимость усовершенствования вакцинных препаратов против туляремии. Методы

диагностики туляремии также нуждаются в оптимизации. Для этого необходимо глубокое комплексное изучение биологических особенностей штаммов возбудителя туляремии, изолированных от разных источников в различных регионах мира, их детальная характеристика. Таксономическая характеристика *Francisella tularensis*, его внутривидовая дифференциация и изучение свойств отдельных таксонов являются фундаментальной основой, которая необходима для разработки принципиально новых способов поиска возбудителя в природе, его идентификации и совершенствования системы диагностики туляремийной инфекции и ее профилактики.

Решение этих задач возможно путем проведения направленного мутагенеза целевых генов *F. tularensis*. Разработка комплекса генодиагностических методов, позволяющих относить выделенные изоляты к определенному подвиду и генетическому кластеру при эпидемиологических расследованиях эпизоотий, спорадических случаев и вспышек туляремии имеет важное значение. Не менее актуальной задачей является конструирование новых туляремийных вакцин путем создания штаммов с целенаправленно модифицированными генами-мишенями. Таким образом, цель диссертационной работы Мокриевича А.Н. - разработать современную методологию диагностики и профилактики туляремии для внедрения в практику здравоохранения простых и надежных способов лабораторной индикации и идентификации *F. tularensis*, а также усовершенствовать молекулярно-генетические подходы для создания улучшенных вакцинных препаратов - и четко сформулированные научные задачи являются своевременными и актуальными.

Научная и практическая ценность диссертации:

Рассматриваемая диссертация характеризуется научной новизной, заключающейся в том, что автором был выявлен новый природный очаг туляремии на территории Южной Сибири Алтайского края, где впервые на территории России выделили культуру *F. tularensis* subsp. *mediasiatrica*. Впервые с помощью полногеномного секвенирования была определена нуклеотидная последовательность генома штамма алтайского геноварианта *F. tularensis* subsp. *Mediasiatrica* и депонирована в GenBankNCBI. По результатам MLVA25-типирования в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск») выделен кластер штаммов *F. tularensis*, MLVA-профили которых несут генетические черты двух подвидов: *tularensis* и *holarctica*.

Результаты исследований позволили установить, что инактивация гена *recA* системы рекомбинации *F. tularensis* приводит к значительному снижению способности к гомологичной рекомбинации, что, в свою очередь, приводит к стойкому сохранению свойств штамма. Это позволит использовать мутации по гену *recA* в создании новых вакцинных штаммов.

Впервые для стабильного снижения реакционных свойств и сохранения протективного потенциала в геноме вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, провели инактивацию одной копии гена *iglC* и гена *recA*.

Результаты исследований показали то, что делеция *purMCDN* повышает у *F.tularensis* потребность в источнике экзопуринов. Это приводит к потере способности размножения как вакцинных, так и вирулентных штаммов в макрофагоподобных клетках, при этом они становятся авирулентными для животных. Исследования показали, что устойчивость ко всем группам β -лактамов, используемых в клинической практике, обеспечивается наличием β -лактамазы *Bla2*, а лактамазы *Bla1* и *Bla3* являются функционально не активными по отношению к ним. Поэтому ген *bla2* может использоваться как мишень при создании экспериментальных штаммов, пригодных для генно-инженерных работ с использованием плазмид, несущих маркеры устойчивости β -лактамам.

Впервые исследования штаммов среднеазиатского подвида показали наличие набора генов, кодирующих β -лактамазы, идентичного штаммам других подвидов. Однако скорость гидролиза антибиотиков выявленными β -лактамазами значительно снижена, что может использоваться в качестве диагностического признака идентификации среднеазиатского подвида. Данное снижение скорости гидролиза β -лактамов, вероятнее всего связано с единичными нуклеотидными заменами в гене *bla2*.

Разработана методология конструирования штаммов с заданными свойствами, которая включает:

- выбор генов-мишеней;
- создание молекулярно-генетических инструментов для инактивации/модификации целевых генов;
- получение панели штаммов с инактивированными генами и изучение их иммунобиологических свойств.

Разработанная методология позволила получить штамм со сниженной реактогенностью при сохранении протективных свойств исходного вакцинного штамма.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации.

Диссертационная работа Мокриевича А.Н. имеет большую практическую ценность, заключающуюся в следующем:

- Разработан способ одновременной регистрации ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени;
- Предложен к применению «Набор реагентов для выявления ДНК чумы, сибирской язвы и туляремии методов ПЦР ВР «MULTU-FLU»;
- Для дифференциации штаммов туляремиального микроба (разных подвидов) предложен метод ПЦР с использованием одного праймера;
- Определен минимальный набор из 17 VNTR-локусов, позволяющий сохранить достоверность получаемых данных о внутривидовой кластеризации исследованных штаммов *F.tularensis*;
- Предложен оптимизированный метод MLVA-типирования, позволяющий существенно упростить распределение по кластерам штаммов туляремиального микроба;

- Разработан и апробирован алгоритм отбора потенциальных вакцинных штаммов *F.tularensis* на основании изучения иммунобиологических свойств панели штаммов, созданных путем целенаправленной модификации генов;
- Созданы суицидные плазмидные векторы и метод трансформации позволяющий проводить сайт-направленный мутагенез генома *F.tularensis*;
- Предложен штамм *F.tularensis* 15/23-1ΔrecA в качестве прототипа туляремийной вакцины с улучшенными свойствами.

Настоящая работа позволила расширить современные представления о механизмах патогенеза и иммуногенеза возбудителя туляремии. В работе сформулированы и обоснованы подходы к выбору молекулярных мишеней для целенаправленной модификации генов для создания живых вакцинных препаратов против туляремии, с использованием их в дальнейшем в профилактических целях.

Выявленная алтайская популяция *F.tularensis* subsp. *mediasiatica* позволила дополнить экологические аспекты внутривидовой таксономии, расширить понимание эволюции микроорганизма и его таксонов циркулирующих в природе.

Полученные результаты были использованы при составлении нормативно-методических документов федерального уровня:

- Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2642-10 «Профилактика туляремии» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 01 августа 2010 г.);
- Методические указания МУК 4.2.2939-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 14 июля 2011 г.);
- Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (под ред. Г.Г. Онищенко и В.В. Кутырева, изд. 2-е, перераб. и доп., 2013 г.).

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации Мокриевича А.Н., могут быть внедрены в работу лабораторий, проводящих исследования возбудителей особо опасных инфекций, при изучении объектов окружающей среды, эпизоотий среди грызунов, эпидемиологических расследованиях вспышек туляремии у людей. Разработанные в диссертации подходы для сайт-направленного мутагенеза генома туляремийного микроба рекомендуется использовать при проведении работ по изучению факторов патогенности и иммуногенности *F. tularensis*, а также при создании улучшенной живой туляремийной вакцины.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. При анализе представленных материалов обращает на себя внимание чрезмерно большой объем диссертации, в которой Обзор литературы занимает 133 (!) страницы, многие разделы представлены скорее как фрагменты учебника, а не диссертационной работы. Однако это замечание не влияет на общую положительную оценку диссертации Мокриевича А.Н.

Заключение

Диссертационная работа Мокриевича Александра Николаевича на тему: «Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, является научно-квалификационным исследованием, результатом которого явилось решение актуальной народно-хозяйственной проблемы – совершенствование вакцинопрофилактики и современной лабораторной диагностики особо опасной инфекции - туляремии.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает 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. Автор представленной диссертационной работы Мокриевич А.Н. заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология. Отзыв обсужден и одобрен на научной конференции отдела эпидемиологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России 19.10.2016 г. (протокол № 7).

Ведущий научный сотрудник научно-организационного отдела
ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор
Русакова Екатерина Владимировна
Москва 123098 ул. Гамалеи д.18
тел.8499 190 44 33

e-mail: Rusakovaev5@yandex.ru

Старший научный сотрудник лаборатории туляремии
ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

кандидат биологических наук
Демидова Татьяна Николаевна
Москва 123098 ул. Гамалеи д.18
тел. 8 (499) 193-73-51;
e-mail: tanide2012@yandex.ru



Подписи Е.В. Русаковой и Т.Н. Демидовой заверяю.

Ученый секретарь Центра
К.б.н.

Кожевникова Л.К.