

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д.208.046.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМ. Г.Н. ГАБРИЧЕВСКОГО» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК**

аттестационное дело № \_\_\_\_\_  
решение диссертационного совета от 10 ноября 2016 г. № 5.

О присуждении Мокриевичу Александру Николаевичу, гражданину Российской Федерации, учёной степени доктора медицинских наук.

**Диссертация** "Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики" по специальностям 03.02.03 – микробиология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология принята к защите 21.07.2016 г. протокол № 4 диссертационным советом Д.208.046.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10). Диссертационный совет утверждён Приказом Министерства образования и науки РФ № 714/нк «О советах по защите докторских и кандидатских диссертаций» от 2 ноября 2012 г., приказ №219/нк от 05.03.2015 г. част. изм.

**Соискатель** Мокриевич Александр Николаевич, 1956 года рождения. В 1980 году с отличием окончил Саратовский государственный медицинский институт по специальности «лечебное дело», с квалификацией «врач». В 1995 г. защитил кандидатскую диссертацию по специальности «микробиология» (спецтема) в диссертационном совете при Государственном «НИИ прикладной микробиологии». Работает в институте с 1980 года, а с 2006 года в должности заведующего отделом особо опасных инфекций в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Диссертация выполнена в отделе особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

**Научные консультанты:** доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор, член-корр. РАН Дятлов Иван Алексеевич, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, директор; доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор

Анисимов Андрей Павлович, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора.

**Официальные оппоненты:** Тотолян Арег Артемович - доктор медицинских наук (14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология), профессор, член-корр. РАН, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», директор; Грубер Ирина Мироновна - доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», заведующая лабораторией экспериментальной микробиологии отдела микробиологии; Щуковская Татьяна Николаевна - доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник отдела иммунологии – дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации, в своем положительном заключении, подписанном Русаковой Екатериной Владимировной, доктором медицинских наук, профессором, ведущим научным сотрудником научного отдела, и Демидовой Татьяной Николаевной, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории туляремии, указала, что диссертационная работа является научно-квалификационным трудом, результатом которого явилось решение актуальной народно-хозяйственной проблемы - разработки современной методологии и тактики диагностики и профилактики особо опасной инфекции - туляремии.

**Соискатель имеет** 133 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации – 82 работы, из них 22 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, 5 патентов, 1 руководство, 17 – в материалах международных и 19 российских конференций, общим объемом 335 страниц и авторским вкладом – 295 страниц. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации: 1) Golovliov, I. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis* / I. Golovliov, A. Sjostedt, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov // FEMS Microbiol Lett. – 2003. – V. 222 (2). – P. 273-280. 2) Мокриевич, А.Н. Биологические свойства и строение липополисахарида вакцинного штамма *Francisella tularensis*, полученного при инактивации гена системы «чувства кворума» *qseC* / А.Н. Мокриевич, А.Н. Кондакова, Э. Валаде, М.Е. Платонов, Г.М. Вахрамеева, Р.З. Шайхутдинова, Р.И. Миронова, Д. Блаха, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко, Т.И. Комбарова, Д. Видаль, В.М. Павлов,

Б. Линднер, И.А. Дятлов, Ю.А. Книрель // Биохимия. – 2010. – Т. 75 – № 4. – С. 539-548. 3) Мокриевич, А.Н. Выделение среднеазиатского подвида туляреминого микроба на территории Алтайского края / А.Н. Мокриевич, В.С. Тимофеев, Т.Ю. Кудрявцева, Г.И. Уланова, С.Б. Карбышева, Р.И. Миронова, Г.М. Вахрамеева, Т.И. Губарева, В.М. Павлов, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 1. – Вып. 115. – С. 66-69. 4) Мокриевич, А.Н. Получение и иммунобиологические свойства вакцинного штамма туляреминого микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *recA* / А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова, Т.Б. Кравченко, И.А. Дятлов, В.М. Павлов // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. – 2015. – № 3. – С. 33-39. 5) Мокриевич, А.Н. Иммуногенность и реактогенность штамма *Francisella tularensis* 15/23-1ΔrecA, кандидата для создания новой живой туляреминой вакцины / А.Н. Мокриевич, Г.М. Титарева, Т.И. Комбарова, Е.А. Ганина, Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, А.И. Борзилов, О.В. Коробова, В.М. Павлов, И.А. Дятлов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 85. – № 6. – С. 74-86.

**На диссертацию и автореферат поступило 8 положительных отзывов от:** 1) д.м.н., профессора Сбойчакова В.Б., заведующего кафедрой микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ; 2) д.м.н. Мека-Меченко Т.В., главного научного сотрудника лаборатории микробиологии и эпидемиологии Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева; 3) д.б.н. Маркова Е.Ю., заведующего биохимическим отделом и к.м.н. Мазепы А.В., старшего научного сотрудника отдела зоонозных инфекций ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; 4) д.м.н. Павлович Н.В., заведующей лабораторией туляремии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора; 5) д.м.н. Федоровой В.А., заведующего отделом зоо- и зооантропонозных бактериальных инфекций ФГБНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт; 6) д.м.н., доцента Краевой Л.А., профессора кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ; 7) к.б.н. Котенева Е.С., заведующего лабораторией природно-очаговых инфекций и д.м.н. Зайцева А.А., ведущего научного сотрудника лаборатории природно-очаговых инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора; 8) д.м.н., доцента Викторова Д.В., заместителя директора по научно-экспериментальной работе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. В отзыве Н.В. Павлович высказана рекомендация не забывать приоритетную роль отечественных ученых в обнаружении фенотипических отличий среднеазиатских штаммов туляреминого микроба. В отзывах отмечено, что представленная работа является самостоятельным, законченным, научно-квалификационным трудом, в котором на самом высоком уровне решена актуальная проблема привлечения новейшей молекулярно-генетической методической базы для лабораторной диагностики и специфической профилактики туляремии.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тематикой научных исследований, компетентностью в вопросах, рассмотренных в диссертации, большим опытом работы в области микробиологии и иммунологии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных исследований, соискателем разработана современная методология конструирования штаммов с заданными свойствами, включающая выбор генов-мишеней, создание молекулярно-генетических инструментов для инактивации/модификации целевых генов, позволившая проводить генно-инженерные манипуляции на возбудителе туляремии на качественно более высоком уровне. Предложены и научно обоснованы подходы к выбору молекулярных мишеней для целенаправленной модификации генов с целью создания живых вакцинных препаратов против туляремии, значительно расширены современные знания о механизмах патогенеза и иммуногенеза этого заболевания. Доказано существование нового природного очага туляремии, в котором циркулирует *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* за пределами Средней Азии - на территории Южной Сибири (Алтайский край) Российской Федерации, что позволяет существенно пересмотреть современные представления о филогеографии туляремийного микроба. Введены представления об алгоритме получения генетически стабилизированных мутантных штаммов туляремийного микроба с заранее обусловленными свойствами – кандидатов в вакцинные. Введены представления о гамма-интерфероне - как цитокиновом маркере иммуногенности и реактогенности вакцинного штамма туляремийного микроба при экспериментальной туляремийной инфекции.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказано влияние ряда генов на свойства туляремийного микроба, прямо или косвенно связанные с вирулентностью. Инактивация гена *qseC* снижает устойчивость туляремийного микроба к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки и способность размножаться в макрофагах; приводит к потере способности продуцировать типичный для *F. tularensis* ЛПС S-формы и вирулентности для мышей. Делеция генов *purMCDN* приводит к полной потере вирулентности, снижению иммуногенности для мышей и способности размножаться в макрофагах в отсутствие пуринов; делеция обеих копий гена *iglC* приводит к полной потере вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ вирулентности и протективности для мышей. Делеция генов *recA* и *recD* приводит к репрессии механизма рекомбинации и повышает стабильность штаммов. Инактивация гена *recD* изменяет ростовые свойства штамма, значительно снижает вирулентность и протективность. Применительно к проблематике диссертации, результативно использован комплекс микробиологических, молекулярно-генетических, иммунологических и биоинформатических методов исследования, позволивший создать потенциальный вакцинный штамм, обладающий сниженной реактогенностью и стабильностью при сохранении иммуногенности и протективности на уровне исходного вакцинного штамма. Изложены данные MLVA-25 типирования о генетическом разнообразии, внутривидовой кластеризации и микроэволюции коллекции штаммов *F. tularensis*, на их основе предложена эволюционная модель распространения среднеазиатского подвида туляремийного микроба по территории Сибири, а также выдвинуто предположение о существовании ветви *F. tularensis*, содержащей признаки

голарктического и неарктического подвидов и являющейся переходной формой от subsp. *tularensis* к subsp. *holarctica*.

Раскрыта причина снижения  $\beta$ -лактамазной активности у штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, заключающаяся в замене Gly $\rightarrow$ Arg в 97 положении белка Bla2. Лактамазы Bla1 и Bla3 у возбудителя туляремии являются функционально неактивными по отношению ко всем группам используемых в клинической практике  $\beta$ -лактамов. Изучена динамика снижения скорости гидролиза антибиотиков у штаммов среднеазиатского подвида по сравнению со штаммами голарктического подвида. Проведена модернизация метода аллельного обмена, основанная на использовании вновь созданных суицидных векторов pGM5 и pGM6, позволившая значительно увеличить эффективность сайт-направленного мутагенеза туляремийного микроба.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработан и внедрен способ одновременной регистрации ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени. Зарегистрирован в Росздравнадзоре (регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2013/1359 от 23 января 2014 г.) «Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени “MULTU-FLU” по ТУ 9398-157-78095326-2012». Получен патент на изобретение (№ 2542395 от 20.02.15 г.) «Набор реагентов и способ выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов». Набор реагентов “MULTU-FLU” изготавливается мелкосерийно на базе ФБУН ГНЦ ПМБ (акт внедрения от 24.07.2015). Разработана тест-система с использованием одного праймера, дающая возможность проведения дифференциации штаммов туляремийного микроба, принадлежащих к различным подвидам (патент на изобретение «Способ дифференцирования подвидов туляремийного микроба» № 2478717 от 10.04.2013 г.). 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>).

Определен минимальный набор из 17 VNTR-локусов, позволяющий в полном объеме сохранить достоверность получаемых данных о внутривидовой кластеризации исследованных штаммов *F. tularensis*. Оптимизированный метод MLVA-типирования дает возможность существенно упростить распределение по кластерам штаммов туляремийного микроба.

Созданы оригинальные суицидные плазмидные векторы и способ их введения в клетки туляремийного микроба методом трансформации. Создан и успешно апробирован алгоритм отбора потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis* на основании изучения иммунобиологических свойств панели штаммов, созданных путем целенаправленной

модификации генов. Предложенный алгоритм направлен на оптимизацию оценки эффективности генетических модификаций при создании новых вакцинных штаммов. Создан штамм *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA, предложенный в качестве прототипа туляремийной вакцины с улучшенными свойствами (патент на изобретение «Штамм *Francisella tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA со сниженной реактогенностью для создания живой туляремийной вакцины и способ его получения» № 2567810 от 10.11.2015 г.). В «ГКПМ-Оболенск» депонированы 14 авторских штаммов, необходимых для изучения пато- и иммуногенеза туляремии и создания прототипов живой туляремийной вакцины с улучшенными свойствами (патенты на изобретение: «Способ стабилизации вакцинного туляремийного штамма» № 2457249 от 27.07.12 г., «Способ аттенуации вакцинного туляремийного штамма» № 2460791 от 10.09.2012). Штаммы *F. tularensis* 15 $\Delta$ bla2 и 15 $\Delta$ bla123 депонированы в «ГКПМ-Оболенск» как перспективные модели для генно-инженерных экспериментов с применением маркеров устойчивости к  $\beta$ -лактамным антибиотикам. Представлены и введены в действие нормативно-методические документы федерального уровня внедрения: 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.). Представлены и внедрены в практическую работу методические рекомендации учрежденческого уровня: «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.).

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные работы проведены в большом объеме и на высоком научно-методическом уровне с применением классических и современных молекулярно-генетических, биологических и иммунологических методов, современных стандартов и подходов к обработке биоинформационных данных, а также сертифицированного оборудования. Молекулярно-генетическими методами было исследовано 159 штаммов *F. tularensis*, представленных в

коллекции «ГКПМ-Оболенск». Теоретические выводы основаны на полученных в настоящем исследовании экспериментальных фактах и согласуются с данными, опубликованными ранее по смежным отраслям. Основная идея базируется на анализе отечественных и мировых данных микробиологических и молекулярно-генетических исследований в области эпидемиологической и клинической генодиагностики туляремиального микроба. Используются авторские и общепринятые методические приемы. Установлено согласование данных, полученных автором, и результатов, опубликованных ранее другими исследователями по данной тематике. Используются сертифицированные методы исследования, компьютерные программы и международные информационные базы данных, а также современные методы статистического анализа, используемые в биологических исследованиях.

Личный вклад состоит в непосредственном участии соискателя на всех этапах исследования: планировании научных экспериментов, получении исходных данных, разработке дизайна метода мультилокусной ПЦР в реальном времени «MULTU-FLU», разработке гипотезы о существовании эволюционно более древней, чем голарктический подвид, ветви *F. tularensis*, в выборе генов мишеней и их целенаправленной инактивации, изучении свойств штаммов с инактивированными генами (микробиологических, иммунобиологических). Самостоятельно автором была проведена обработка и интерпретация экспериментальных данных, подготовлены публикации по теме диссертации.

На заседании 10 ноября 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Мокриевичу А.Н. учёную степень доктора медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 12 докторов наук по специальности 03.02.03 – «микробиология», участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета, и 5 приглашенных докторов наук по специальности 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология», проголосовали: за – 23, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета,  
Заслуженный деятель науки РФ,  
доктор биологических наук, профессор



Алешкин Владимир Андрианович

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

11 ноября 2016 г.