

**Заключение Комиссии Диссертационного Совета Д.208.046.01 при ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора по докторской 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 и 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки)**

Диссертационная работа Мокриевича Александра Николаевича соответствует специальностям 03.02.03 – микробиология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки).

**Научные консультанты:**

директор ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Дятлов Иван Алексеевич;

заместитель директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, доктор медицинских наук, профессор Анисимов Андрей Павлович.

Работа посвящена разработке современной методологии диагностики и профилактики туляремии для внедрения в практику здравоохранения простых и надежных способов лабораторной индикации и идентификации *F. tularensis*, усовершенствованию молекулярно-генетических подходов для создания улучшенных вакцинных препаратов. В результате выполнения исследования диссертантом разработан комплексный подход идентификации возбудителя туляремии методами генодиагностики, состоящий из трех этапов; показано, что на территории Российской Федерации в Южной Сибири (Алтайский край) циркулирует эндемичная генетически обособленная популяция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, хотя ранее штаммы этого подвида выделялись только на территории Средней Азии; выяснена причина снижения  $\beta$ -лактамазной активности штаммов среднеазиатского подвида туляремиального микроба, связанная со значительным снижением скорости гидролиза антибиотиков по сравнению со штаммами других подвигов; созданы суицидные векторы, позволившие повысить эффективность аллельного обмена в туляремиальном микробе и разработать панель штаммов с инактивированными генами, изучение иммунобиологических свойств которых обусловило выбор генов-мишеней для создания вакцины с улучшенными свойствами; получен штамм



*F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* с целенаправленно deletированными одной копией гена *iglC* и геном *recA*, обладающий сниженной реактогенностью и стабильностью биологических свойств при сохранении иммуногенности и протективности на уровне исходного вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ; предложен упрощенный алгоритм отбора потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis*, позволяющий повысить научную и экономическую эффективность выбора вновь создаваемых штаммов за счет использования мышинной модели экспериментальной туляремии, а также модели *in vitro* на линиях мышинных макрофагов в качестве альтернативы лабораторным животным.

Выявленный на территории России новый природный очаг туляремии с циркуляцией среднеазиатского подвида туляремийного микроба позволяет существенно пересмотреть современные представления о филогеографии возбудителя туляремии. Впервые с помощью полногеномного секвенирования определена нуклеотидная последовательность генома штамма алтайского геноварианта *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, которая депонирована в GenBank NCBI. По результатам MLVA25-типирования в «ГКПМ-Оболенск» выделен кластер штаммов *F. tularensis*, MLVA-профили которых несут генетические черты двух подвигов: *tularensis* и *holarctica*. Установлено, что инактивация гена *recA* системы рекомбинации *F. tularensis* приводит к значительному снижению способности к гомологичной рекомбинации и, как следствие, к стойкому сохранению свойств штамма, что позволяет использовать мутации по этому гену для стабилизации наследуемых свойств при создании новых вакцинных штаммов. Впервые показано, что инактивация одной копии гена *iglC* и гена *recA* в геноме вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ стабильно снижает его реактогенные свойства при сохранении протективного потенциала. Обнаружено, что лактамазы Bla1 и Bla3 являются функционально неактивными по отношению ко всем группам используемых в клинической практике  $\beta$ -лактамов, а устойчивость к ним обеспечивает только сериновая  $\beta$ -лактамаза Bla2. Ген *bla2* может использоваться как мишень при создании лабораторных штаммов, пригодных для генно-инженерных работ с использованием плазмид, несущих маркеры устойчивости к  $\beta$ -лактамам. Впервые показано, что штаммы среднеазиатского подвида несут набор генов, кодирующих  $\beta$ -лактамазы, идентичный штаммам других подвигов, и обладают  $\beta$ -лактамазной активностью. Однако скорость гидролиза антибиотиков у них значительно снижена, что и используется в качестве



диагностического признака идентификации среднеазиатского подвида. Снижение скорости гидролиза  $\beta$ -лактамов связано, скорее всего, с единичными нуклеотидными заменами в гене *bla2*. Разработана методология конструирования штаммов с заданными свойствами, включающая выбор генов-мишеней, создание молекулярно-генетических инструментов для инактивации/модификации целевых генов, получение панели штаммов с инактивированными генами и изучение их иммунобиологических свойств, позволившая получить штамм со сниженной реактогенностью при сохранении протективных свойств исходного вакцинного штамма.

Сформированы и научно обоснованы подходы к выбору молекулярных мишеней для целенаправленной модификации генов с целью создания живых вакцинных препаратов против туляремии, что позволило значительно расширить современные знания о механизмах патогенеза и иммуногенеза этого заболевания. Дополнены современные представления о микроэволюции и разнообразии внутривидовых групп туляремийного микроба. Предложена эволюционная модель появления и распространения среднеазиатского подвида туляремийного микроба, циркулирующего на территории Южной Сибири (Алтайский край), согласно которой среднеазиатский подвид произошел от проникшего из Америки в Евразию *F. tularensis* subsp. *tularensis*, миграция которого на запад вдоль цепи водоемов сопровождалась снижением вирулентности и уменьшением лактамазной активности. Алтайская популяция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* является, вероятно, эволюционно более древней, чем Среднеазиатская, так как находится значительно восточнее. Выдвинута гипотеза о вероятности существования эволюционно более древней, чем голарктический подвид, ветви *F. tularensis*, являющейся, возможно, переходной формой от subsp. *tularensis* к subsp. *holarctica* на основании данных MLVA-типирования и выявления отдельной филогенетической группы Nevada, содержащей признаки голарктического и неарктического подвидов *F. tularensis*.

Результаты проведенных исследований послужили основой или были учтены при составлении нормативно-методических документов 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.).

Разработан и рекомендован к применению 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). Предложен метод ПЦР с использованием одного праймера, дающий возможность проведения дифференциации штаммов туляремиального микроба, принадлежащих к различным подвидам. Разработанная тест-система успешно прошла лабораторные внутренние и подготовлена для проведения технических испытаний (патент на изобретение «Способ дифференцирования подвидов туляремиального микроба» № 2478717 от 10.04.2013 г.). Разработан 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. Созданные оригинальные суицидные плазмидные векторы и способ их введения в клетки туляремиального микроба методом трансформации позволяют проводить сайт-направленный мутагенез генома *F. tularensis*. Штамм *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* предложен в качестве прототипа туляремиальной вакцины с улучшенными свойствами (патент на изобретение «Штамм *Francisella tularensis* 15/23-1 $\Delta$ *recA* со сниженной реактогенностью для создания живой туляремиальной вакцины и способ его получения» № 2567810 от 10.11.2015 г.). Определен минимальный набор из 17 VNTR-локусов, позволяющий в полном объеме сохранить достоверность получаемых данных о внутривидовой кластеризации исследованных штаммов *F. tularensis*. В «ГКПМ-Оболенск» депонированы авторские



штаммы, необходимые 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  $\beta$ -лактамам антибиотикам. Штамм *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta$ recA предложен в качестве прототипа туляремийной вакцины с улучшенными свойствами.

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе при чтении лекций и проведении практических занятий для слушателей курсов повышения квалификации на базе отдела образовательных программ и подготовки специалистов РосНИПЧИ «Микроб» (акт внедрения от 03.02.2016). Результаты исследования включены в лекционный материал при реализации программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре ФБУН ГНЦ ПМБ по направлению 06.06.01 – биологические науки (направленность программы - микробиология) (акт внедрения от 11.01.2016). Разработанные молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, применяются в Иркутском НИПЧИ при выполнении НИР 012-3-16 «Изучение биомедицинских особенностей туляремии и закономерностей функционирования природных очагов Сибири и Дальнего Востока» (акт внедрения от 22.01.2016). Материалы диссертации используются в работе по изучению природных очагов туляремии на юге России, подвидовой дифференциации и характеристике изолятов *F. tularensis*, изучению особенностей эпидемического процесса, выполняемых в рамках деятельности регионального научно-методического центра по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней Северо-Кавказского и Южного федеральных округов (акт внедрения от 10.02.2016).

По объему проведенных исследований, их новизне, теоретической и практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки).



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

Анализ проверки диссертации и автореферата с помощью системы «Антиплагиат» на сайте [www.antiplagiat.ru](http://www.antiplagiat.ru) показал, что оригинальный текст составляет 93,42 %, в тексте диссертации и автореферате имеются корректные совпадения с данными литературы.

В качестве ведущей организации рекомендуется утвердить Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Согласие ведущей организации имеется.

В качестве официальных оппонентов предлагаются:

1. Тотолян Арег Артемович – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, врио директора федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора (14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология).

2. Грубер Ирина Мироновна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией экспериментальной микробиологии отдела микробиологии федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии наук (03.02.03 – микробиология).

3. Щуковская Татьяна Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”» Роспотребнадзора (03.02.03 – микробиология).

В связи с тем, что диссертация выполнена по двум специальностям: 03.02.03 – микробиология и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, ввести в состав Диссертационного Совета на разовую защиту с правом решающего голоса пять докторов наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология:

- Калюжина Олега Витальевича, доктора медицинских наук, профессора кафедры клинической иммунологии и аллергологии факультета

послевузовского профессионального образования врачей ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России;

- Кудрявцеву Асю Валерьевну, доктора медицинских наук, ведущего научного сотрудника НИО педиатрии НОК центра «Здоровый ребенок» при кафедре детских болезней ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России;

- Лядову Ирину Владимировну, доктора медицинских наук, профессора, заведующую лабораторией биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза;


- Куралесову Альбину Ивановну, доктора биологических наук, главного научного сотрудника ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России;

- Терентьева Александра Александровича, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой биохимии лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России.

Заключение подготовили члены Диссертационного Совета:

Председатель комиссии:

Доктор медицинских наук,  
профессор, заслуженный  
деятель науки РФ



Афанасьев  
Станислав Степанович

Члены комиссии:

Доктор медицинских наук,  
профессор



Пчелинцев  
Сергей Юрьевич

Доктор медицинских наук,  
профессор



Степанов  
Алексей Вячеславович

Доктор биологических наук,  
профессор



Шемякин  
Игорь Георгиевич

Член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук,  
профессор



Караулов  
Александр Викторович

Доктор медицинских наук,  
профессор



Федоскова  
Татьяна Германовна