

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Щуковской Татьяны Николаевны на диссертационную работу Горбатова Алексея Александровича на тему «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### **Актуальность темы исследования**

Туляремия - широко распространенная в мире опасная инфекционная болезнь с природной очаговостью, характеризующаяся множественностью носителей, переносчиков и механизмов передачи инфекции. Также возбудитель туляремии, относящийся к микроорганизмам II группы патогенности [СП 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)"], рассматривается в качестве одного из высокопотенциальных агентов биотерроризма. В настоящее время ареал возбудителя туляремии охватывает практически все страны северного полушария, находящиеся между 30° и 70° с. ш. В Российской Федерации, почти на всей её территории, зафиксировано наличие природных очагов туляремии, эпизоотическая активность которых подтверждается ежегодным выделением возбудителя туляремии из биотических и абиотических объектов окружающей среды.

В этой связи актуальность проблемы качества лабораторной диагностики данной инфекции, включая разработку новых диагностических препаратов, не вызывает сомнений. Также следует отметить, что совершенствование приемов выделения антигенов в иммунологически активной форме, получения рекомбинантных антигенов и их детальная характеристика являются важными условиями в схеме разработки новых иммунодиагностических препаратов. В соответствии с действующими нормативно-методическими документами для лабораторного подтверждения клинического диагноза туляремии применяется целый ряд аллергических и иммуносерологических методов исследования, таких как кожная проба с тулярином, реакция лейкоцитолита, реакция непрямой гемагглютинации, реакция агглютинации, метод флуоресцирующих антител, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации антител [МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией»; МУК 4.2.2939-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней»]. В настоящее время в РФ для выявления специфических антител к туляремийному микробу зарегистрированы набор реагентов диагностикум туляремийный «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» (производства Ставропольского НИПЧИ), набор реагентов "Диагностикум туляремийный жидкий для объемной и

кровянокапельной реакции агглютинации" (АО «НПО «Микроген» Минздрава России). Тем не менее, следует отметить недостаточную чувствительность агглютинационных тестов, вероятность перекрестной реакции сывороток больных туляремией с бактериями *Brucella*, *Yersinia*, *Proteus* spp. [Nakajima R. et al., 2016], затруднение в дифференциации постинфекционной сероконверсии от поствакцинальной. Все это обуславливает необходимость совершенствования серологических методов для диагностики туляремией, применяемых как для постановки предварительного диагноза, так и для оценки напряженности поствакцинального иммунитета и проведения эпидемиологического мониторинга в эндемичных районах.

Учитывая вышеизложенное, актуальность и обоснованность темы диссертационной работы Горбатова Алексея Александровича, посвященной изучению диагностического потенциала антигенов бактерий *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* и разработке на их основе иммунохроматографических тестов для ускоренной серодиагностики туляремией, не вызывает сомнений и имеет большое научное и практическое значение для здравоохранения.

**Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Поставленные автором цель и задачи успешно выполнены. Результаты исследования, изложенные в диссертационной работе, позволили автору сформулировать положения и выводы, характеризующиеся высокой степенью новизны.

Диссертантом впервые сконструирован штамм-продуцент *E. coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинантного белка FTT1696 *F.tularensis*, клонированного в составе вектора pET32b (Novagen USA), показана специфичность данного белкового антигена для штаммов *F.tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*, установлена его высокая диагностическая значимость, позволяющая рекомендовать рекомбинантный белок FTT1696 к использованию в иммунохроматографических тестах для серодиагностики туляремией.

С применением электронной микроскопии получены новые данные о соотношении гидрофильной и гидрофобной частей в липополисахариде (ЛПС) бактериальных клеток штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*, выявлена корреляция данного показателя с толщиной капсульного вещества для штамма каждого подвида и вирулентностью для подвидов *tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*.

На различных видах биомодельных животных с разной степенью чувствительности к туляремийной инфекции (морские свинки, кролики, крысы) диссертантом получены убедительные доказательства возможности дифференциации поствакцинальной и

постинфекционной сероконверсии с использованием охарактеризованных препаратов ЛПС *F. tularensis* и *F. novicida* для постановки иммунологических тестов (иммуноблот, дот-блот анализ, ИХА).

Для разработанных иммунохроматографических тестов автором предложена новая комбинация антигенов: ЛПС *F. tularensis*, ЛПС *F. novicida*, рекомбинантного белка FTT1696, повышающая чувствительность и специфичность серодиагностики туляремии.

В целом, научные положения, выводы и рекомендации убедительно аргументированы, четко сформулированы и логически вытекают из проделанной работы.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость представленной работы заключается в том, что предложена научная гипотеза, объясняющая явление серопозитивности сывороток людей и различных видов животных, инфицированных вирулентными штаммами *F. tularensis*, в отношении ЛПС *F. novicida*, которое не регистрируется в сыворотках вакцинированных. Обоснована целесообразность применения комплексных антигенов туляремийного микроба – тулярина, ультразвукового дезинтеграта, кислотонерастворимого комплекса – в качестве специфических индукторов продукции *in vitro* IFN- $\gamma$  иммунокомпетентными клетками для оценки напряженности клеточного иммунитета. Важным представляется обоснование значимости включения рекомбинантного белка FTT1696 в пул антигенов для серодиагностики туляремии.

Практическая значимость работы заключается в том, что в рамках создания потенциального импортозамещающего продукта автором были разработаны и апробированы универсальные иммунохроматографические тесты на основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, с охарактеризованными антигенами ЛПС *F. tularensis*, ЛПС *F. novicida*, рекомбинантным белком FTT1696, для обнаружения специфических антител к туляремийному микробу, которые могут использоваться для комплексной серодиагностики туляремии у людей и животных, а также способствовать улучшению качества лабораторной диагностики данной инфекции.

В «Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов-Оболенск» депонирован высокопродуктивный штамм-продуцент *E. coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинантного белка FTT1696 (справка № В8363 от 29.01.2018 г.).

Созданы, утверждены на учрежденческом уровне и внедрены в практическую работу лабораторий 2-е методических рекомендаций:

- «Оценка напряженности специфического клеточного иммунитета у людей к возбудителю туляремии *in vitro*» (одобрены Ученым советом Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и

биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) и утверждены директором, протокол Ученого совета № 8 от 07.10.2011 г.);

- «Методика оценки напряженности специфического иммунитета к туляремии на мышинной модели при иммунизации потенциальными вакцинными штаммами» (одобрены Ученым советом Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии и утверждены директором, протокол Ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ № 8 от 29.10.2015 г.).

Разработано практическое пособие «Методы изучения возбудителя туляремии» (Под ред. академика РАН И.А. Дятлова. Авторы: А.Н. Мокриевич, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Г.М. Вахрамеева, А.А. Горбатов, И.А. Дятлов, Т.И. Комбарова, П.Х. Копылов, Т.Ю. Кудрявцева, Л.И. Маринин, Р.И. Миронова, А.Н. Сомов, В.С. Тимофеев, Е.А. Тюрин, В.В. Фирстова, Р.З. Шайхутдинова, Н.А. Шишкова. - Оболensk.: ФБУН ГНЦ ПМБ, 2018).

Материал настоящего исследования используется в рамках работы:

- Центра индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности при Федеральном бюджетном учреждении науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (акт внедрения от 17.01.2018);

- Испытательного лабораторного центра противочумной станции в Федеральном государственном учреждении здравоохранения «Медико-санитарная часть № 164» (акт внедрения от 14.02.2018).

- в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте при выявлении специфических антител в сыворотках людей, вакцинированных против туляремии, при дополнительных диагностических исследованиях, а также в отделе профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов в программах обучения (акт внедрения от 10.02.2018).

#### **Достоверность и апробация результатов исследования**

Достоверность исследований в настоящей работе не вызывает сомнений, базируется на корректных теоретических положениях, демонстрирующих глубокое знание современной литературы по проблеме исследований, и доказывается использованием широкого спектра микробиологических, электронно-микроскопических, молекулярно-генетических, биохимических, иммунологических, биоинформационных и статистических методов исследования, выполненных на сертифицированном оборудовании, достаточным объемом выборки штаммов микроорганизмов родов *Francisella*, *Brucella*, *Escherichia*, образцов клинического и экспериментального материала, объемом проведенных

исследований. При определении валидности диагностических тестов использованы стандартизованные методологические подходы.

Основные положения и выводы диссертации отражены в 15 печатных работах, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, входящих в международные базы данных и системы цитирования (SCOPUS, WoS (BIOSIS), Pubmed). Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на 3-х международных и Всероссийской конференциях: 1-ой Международной конференции по инфекционным заболеваниям и наномедицине (Непал, Катманду, 2012); Международном симпозиуме по опасным заболеваниям (Австрия, Вена, 2014); Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Россия, Сочи, 2015); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные заболевания» (Россия, Сочи, 2017).

#### **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Диссертация Горбатова А.А. изложена на 183 страницах машинописного текста, имеет общепринятую структуру и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка цитированной литературы, включающего 294 источника (74 отечественных и 220 зарубежных авторов). Работа иллюстрирована 26 рисунками и 17 таблицами.

Во введении автор обосновывает актуальность и необходимость проведения исследования, дает объективную информацию о степени разработанности темы, компетентно формулирует цель и задачи исследования, аргументирует новизну, теоретическую и практическую значимость работы, приводит основные положения, выносимые на защиту. Отдельно во введении изложены методология и современные высокотехнологичные методы исследования, применявшиеся при выполнении диссертационной работы.

Обзор литературы состоит из пяти подразделов, базируется на анализе 294 источников, написан хорошим литературным языком и логически выстроен. В нем изложены основные данные по биологии возбудителя туляремии, проанализированы имеющиеся сведения о распространении на современном этапе туляремии в мире и на территории Российской Федерации, приведена действующая таксономия *Francisella tularensis*. Особое внимание уделено структурно-функциональным особенностям поверхностных структур и иммунодоминантных антигенов *F. tularensis*, их роли в

реализации патогенных и иммуногенных свойств бактерий вида *F. tularensis*, значимости для иммунодиагностики туляремии. Проведенный автором подробный анализ рассматриваемой проблемы убедительно обосновывает выбор направлений собственных исследований.

Экспериментальной части работы посвящены 4 главы собственных исследований. В 2-ой главе «Липополисахарид туляремийного микроба – уникальный антигенный компонент клеточной стенки» приведены оригинальные исследования, в которых охарактеризованы липополисахариды клеточной стенки бактериальных клеток *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*, проведен сравнительный анализ их гидрофобной и гидрофильной составляющих, определены иммунологически активные структуры в молекуле ЛПС *F. tularensis* различных подвидов. По результатам выполненных исследований автором выдвинуто предположение, что толщина капсулы у туляремийного микроба связана с соотношением углеводной (гидрофильной) составляющей к липиду А (гидрофобной) молекулы ЛПС. Установлена корреляция данного показателя с толщиной капсульного вещества для штамма каждого подвида и вирулентностью для подвидов *tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*.

В главе 3 «Белок GroEL FTT1696 – иммунодиагностически значимый антиген туляремийного микроба» автором представлен новый собственный материал по конструированию штамма-продуцента *E. coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинантного белка FTT1696 *F. tularensis*, клонированного в составе вектора pET32b, представлены убедительные доказательства специфичности данного белкового антигена для штаммов *F. tularensis* различных подвидов. Научно-практический интерес представляют разделы главы, посвященные результатам изучения возможности применения рекомбинантного белка FTT1696 для выявления специфических антител в экспериментальном и клиническом биологическом материале, свидетельствующие о его иммунологической активности и диагностической значимости.

В 4-ой главе изложены результаты по отбору высокоспецифичных иммунодоминантных антигенов *F. tularensis*, универсальных для трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), и оценке их диагностической значимости для определения уровня клеточного и гуморального иммунитета как в условиях моделирования инфекционного и вакцинального процесса на различных видах лабораторных животных, так и на клиническом материале, полученном от больных туляремией и вакцинированных лиц. На основании собственных исследований диссертантом предложено применение комплексных антигенов бактерий *F. tularensis* – ультразвукового дезинтеграта, кислотонерастворимого комплекса, тулярина, в качестве специфических индукторов продукции *in vitro* IFN- $\gamma$

иммунокомпетентными клетками для оценки напряженности клеточного иммунитета. Для выявления специфических антител при туляремии в качестве оптимальных определены методы иммуноферментного и/или иммунохроматографического анализа с использованием в качестве антигена ЛПС *F. tularensis*, как дающих наименьшее количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

В главе 5 изложен объемный материал по разработке и апробации иммунохроматографических тестов на основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, с новой комбинацией антигенов - ЛПС *F.tularensis*, ЛПС *F.novicida*, рекомбинантным белком FTT1696, для экспрессной серодиагностики туляремии, в частности для раннего выявления спорадических случаев туляремии, для дифференцирования постинфекционного и поствакцинального туляремийного иммунитета.

Каждая глава собственных исследований завершается обсуждением результатов, что позволяет объективно оценивать новизну и значимость полученного фактического материала. В общем заключении достаточно полно обобщены и проанализированы основные результаты диссертационного исследования. Сформулированные автором практические рекомендации направлены на широкое использование апробированного метода иммуноферментного анализа с применением очищенного препарата липополисахарида *F. tularensis* в качестве адсорбированного антигена, использования разработанных иммунохроматографических тестов для мониторинговых эпидемиологических обследований природных очагов туляремии.

#### **Соответствие специальности**

Тема диссертации, выносимые на защиту основные положения и выводы соответствуют пунктам 3,10 паспорта специальности 03.02.03 – микробиология. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и удовлетворяет требованиям ГОСТ 7.0.11. – 2011.

Принципиальных замечаний к диссертации нет. Встречаются единичные опечатки и некоторые стилистические погрешности, которые не ставят под сомнение полученные результаты и не снижают их значимости. Работа заслуживает высокой положительной оценки.

#### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Горбатова Алексея Александровича на тему «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной социально-экономически значимой научной задачи – определен диагностический потенциал антигенов бактерий *F. tularensis* подвидов *tularensis*,



*holarctica, mediasiatica, novicida* и разработаны на их основе иммунохроматографические тесты для ускоренной серодиагностики туляремии, осуществляемой в целях охраны здоровья и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Диссертационная работа Горбатова Алексея Александровича на тему «Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в диагностике туляремии», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям 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 диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Горбатов Алексей Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник отдела  
иммунологии Федерального казенного  
учреждения здравоохранения «Российский  
научно-исследовательский противочумный  
институт “Микроб”» Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека  
доктор медицинских наук,  
профессор

Почтовый адрес места работы:  
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46.  
Тел.: 8 (8452) 26-21-31 (доп. 357); e-mail:  
rusrap@microbe.ru

 Щуковская Татьяна Николаевна

07.05.2019 г.

Подпись доктора медицинских наук,  
профессора Щуковской Татьяны Николаевны заверяю:

Ученый секретарь Федерального казенного  
учреждения здравоохранения «Российский  
научно-исследовательский противочумный  
институт “Микроб”» Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека  
кандидат медицинских наук

  
Чеховская Галина Викторовна