

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Пьянкова Степана Александровича  
«ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА:  
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИРОДНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ  
СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальностям: 03.02.02 – вирусология  
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**Актуальность темы.** Инфекционные болезни во все времена были главными врагами человека. В истории человечества сохранились примеры опустошительных эпидемий чумы, оспы, холеры, туберкулеза и гриппа. Несмотря на достижения современной медицины сохраняется угроза возникновения новых эпидемий. Лабораторная диагностика является важным компонентом системы эпидемиологического контроля инфекционных болезней. Расширяя территории проживания, люди вторгаются в места природного обитания переносчиков инфекций. А с активным развитием туризма и роста миграционных процессов инфекции, возникшие в различных частях земного шара, могут быстро распространиться в другие регионы. Значительную угрозу представляют контагиозные геморрагические лихорадки. К наиболее опасным вирусам, вызывающим геморрагические лихорадки, относятся представители семейства *Filoviridae* – вирус Эбола и вирус Марбург, летальность от которых превышает 50%. С 2003 года зафиксировано несколько вспышек и крупных эпидемий лихорадки Эбола в ряде стран экваториальной Африки. Диагностированы единичные случаи, в то числе один летальный, завозной лихорадки Эбола в Европе. Эффективных терапевтических средств и вакцины против лихорадки Эбола на данный момент не существует. Специализированные лабораторные тесты могут регистрировать как определенные антигены/гены вируса Эбола, так и антитела к вирусу Эбола, однако тестирование образцов крови больных связано с большим риском заражения и должно проводиться с соблюдением максимального уровня биологической защиты. Для оценки специфической активности разрабатываемых терапевтических и профилактических препаратов против лихорадки Эбола также необходимы средства дифференциальной диагностики возбудителя. В связи с этим актуальность диссертационной работы Пьянкова С. А., связанная с разработкой средств иммунодиагностики лихорадки Эбола и оценкой эффективности их применения, не вызывает сомнения.

**Научная новизна** диссертационной работы также не вызывает сомнения. Автор впервые показал антигенную идентичность адаптированного на морских свинках

лабораторного штамма и актуального штамма *Zaire ebolavirus*, выделенного из крови больного лихорадкой Эбола во время эпидемии в Гвинейской Республике в 2015 г. Автором была отработана оптимальная схема получения препаративных количеств исследуемых штаммов *Zaire ebolavirus* с использованием культуры клеток и восприимчивых животных. Во время исследования были разработаны методы очистки и инактивации вирусных частиц анализируемых штаммов *Zaire ebolavirus*, а также метод контроля отсутствия остаточной инфекционной активности созданных на их основе препаратов. Впервые был получен цельновирионный антиген вируса Эбола, более эффективно, чем отдельные рекомбинантные белки или синтетические пептиды, связывающий специфические антитела. Автор впервые показал, что использование цельновирионного антигена *Zaire ebolavirus* в качестве компонента диагностического набора для ИФА приводит к увеличению до двух лет период обнаружения специфических IgG в крови людей, перенесших лихорадку Эбола. Была показана эффективность использования диагностического набора на основе цельновирионного антигена для выявления антител к единичным эпитопам *Zaire ebolavirus* при оценке специфической активности полиэпитопной вакцины «ЭпиВакЭбола».

**Теоретическая и практическая значимость результатов.** Проведенные сравнительные исследования лабораторного и актуального штаммов *Zaire ebolavirus* важны для фундаментальной науки, поскольку расширяют наши знания об антигенных свойствах особо патогенного вируса Эбола. Утвержденная и внедренная в ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора стандартная операционная процедура «Производство цельновирионного концентрированного очищенного инаktivированного антигена вируса Эбола» имеет, несомненно, практическую значимость и перспективу в использовании подобной процедуры при получении инаktivированных антигенов других вирусов, вызывающих геморрагические лихорадки. Разработанный и зарегистрированный в Российской Федерации «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин», созданный на основе иммуносорбента с очищенным инаktivированным антигеном *Zaire ebolavirus*, был апробирован во время эпидемии в Гвинейской Республике в 2015 г. Набор реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» был использован в различных диагностических лабораториях для тестирования реконвалесцентов в Гвинейской Республике, а также для оценки эффективности разрабатываемой вакцины «ЭпиВакЭбола».

**Достоверность результатов** диссертационного исследования обеспечивается репрезентативной выборкой из 1230 образцов контрольной панели сывороток и плазмы крови человека и животных, содержащих и не содержащих антитела к *Zaire ebolavirus*, и



применением современных и классических методов исследования. Разработка технологии производства природного антигена *Zaire ebolavirus*, а также сравнительный анализ антигенных свойств штаммов вируса проводились лично автором. Клинические образцы сыворотки и плазмы крови человека были отобраны на основе экспериментальных данных, лично полученных автором в полевых условиях действовавшего мобильного комплекса санитарной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора во время эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике в 2015 г. Автор принимал участие в разработке документации и испытаниях экспериментальных серий набора реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин». Результаты работы были представлены на научно-практических конференциях. По теме диссертационной работы опубликована 21 научная публикация, в том числе 10 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 4 научные монографии. Получено 6 патентов РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа Пьянкова Степана Александровича имеет традиционную структуру и изложена на 150 страницах. Она содержит «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Список работ, опубликованных по теме диссертации», «Список литературы» и «Приложение 1–6». Работа иллюстрирована 11 таблицами и 14 рисунками. Список литературы содержит 222 публикации, включая 20 российских.

**Во введении** автор обосновывает актуальность работы, на основании которой формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Далее перечисляются положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов проведенных исследований, приводятся сведения о личном вкладе автора, апробации материалов и публикациях по теме диссертации. Цель исследования и задачи сформулированы корректно; положения, выносимые на защиту, базируются на ключевых результатах диссертационного исследования.

**Обзор литературы** состоит из двух основных разделов. Первый раздел освещает актуальность дифференциальной диагностики возбудителей геморрагических лихорадок и состоит из 4-х подразделов. В первом подразделе автор достаточно подробно останавливается на современной таксономии вирусов семейства *Filoviridae*, эпидемиологических данных по вспышкам заболеваний, вызванных вирусом Эбола и вирусом Марбург, а также описывает виды млекопитающих и членистоногих паразитов, которые могут служить природными резервуарами вируса Эбола. Во втором подразделе автор описывает строение вириона и генома вируса Эбола, сравнивая его с геномами других представителей семейства *Filoviridae*. В третьем подразделе приведена известная

на данный момент информация об иммунном ответе организма человека при лихорадке Эбола. В четвертом подразделе описаны классические и современные средства диагностики лихорадки Эбола. Во втором разделе приведены рекомендации ВОЗ по предупреждению эпидемий, вызываемых филовirusами, описаны действия в случае эпидемии, мониторинг эпидемиологической обстановки и методы диагностики лихорадки Эбола. Четвертый подраздел освещает вопросы создания терапевтических и профилактических препаратов против вируса Эбола, а также процедур их испытания. В целом, автор широко проанализировал современные проблемы, касающиеся эпидемиологии и диагностики лихорадки Эбола, а также актуальность создания эффективных терапевтических и профилактических препаратов. Обзор литературы написан хорошим научным языком и логически связан с последующим текстом диссертации. К незначительным недочетам данного раздела можно отнести явные опечатки, сделанные на стр. 46 «...доказательств любого другой способ вторичной передачи...» и стр. 54 «Ряд исследователей считают, что...».

**Материалы и методы исследования** адекватны поставленным задачам. В данном разделе приведена подробная информация о происхождении штаммов *Zaire ebolavirus*, методах культивирования живого вируса на культуре клеток, а также с использованием восприимчивых лабораторных животных. Все работы с живым вирусом проводились в соответствии с требованиями санитарных правил «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» в условиях максимально изолированной лаборатории, соответствующей международному уровню BSL-4. Нуклеотидные последовательности геномной РНК использованных штаммов *Zaire ebolavirus* зарегистрированы в международной базе данных GenBank (NCBI, USA). Исследования выполнены на образцах сыворотки и плазмы крови как человека ( $n = 871$ ), так и животных ( $n = 359$ ): нечеловекообразных приматов, кроликов и морских свинок. Препаратами сравнения при определении диагностической эффективности набора «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» служили коммерческие наборы регентов для ИФА производства США. В работе использован необходимый набор современных методов молекулярной вирусологии и биоинформатики. Часть исследования, включающая участие людей проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, в соответствии с правилами надлежащей клинической практики и законодательством Российской Федерации и Гвинейской Республики, на соответствующих территориях.

В главе «**Результаты и их обсуждение**» последовательно приведены этапы проведения экспериментов и результаты, полученные на фактическом материале. Результаты собственных исследований соискателя описаны понятным языком и хорошо



иллюстрированы. Представленный объем фактического материала репрезентативен и достаточен для решения поставленных задач и получения достоверных результатов. Соискатель принимал участие в разработке и патентовании технологии получения природного инактивированного очищенного цельновирионного антигена *Zaire ebolavirus*. В репрезентативной выборке из 1230 анализируемых образцов сыворотки и плазмы крови человека и животных, 651 образец содержал специфические антитела к *Zaire ebolavirus*. В ходе исследования была выявлена более высокая диагностическая эффективность природных антигенов по сравнению с рекомбинантным аналогом белка VP40 и со смесью двух синтетических пептидных аналогов, содержащих антигенные эпитопы оболочечного гликопротеина GP *Zaire ebolavirus*. На основе природного антигена из лабораторного штамма 8МС было разработано медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для совместного и раздельного иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин», которое, после успешно проведенных независимых технических/клинических испытаний, зарегистрировано в Российской Федерации и внедрено в производство. Автором установлена высокая эффективность применения разработанного набора с целью а) иммунодиагностики лихорадки Эбола для определения стадии заболевания; б) мониторинга напряженности коллективного иммунитета на эндемичных для лихорадки Эбола территориях; и с) оценки эффективности специфических профилактических препаратов.

В **Заключении** автор обобщил полученные данные. Диссертацию завершают четыре четко сформулированных вывода, которые полностью соответствуют поставленным задачам и основаны на фактических данных, полученных автором. Практическая значимость результатов подтверждается патентом РФ № 2631937 на штамм *Zaire ebolavirus* и регистрационным удостоверением № РЗН 2015/3458 на медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин»; соответствующие документы автором приведены в Приложение 1–6.

**Автореферат** отражает содержание диссертационной работы, в нем представлены все необходимые рисунки, таблицы, полный список публикаций и патентов автора. По форме и содержанию автореферат соответствует требованиям ВАК.

**Вопросы и замечания.** Принципиальных замечаний к полученным результатам и их обсуждению не имею. В рамках дискуссии к соискателю есть вопрос, связанный с данными в таблице 10. В пробе №7 от 20-летнего донора через 2 года 1 месяц от начала заболевания был выявлен высокий уровень IgG (1:800), что в 4-8 раз выше, чем у других обследованных доноров. Антитела класса IgG обеспечивают устойчивый иммунитет против инфекции, при этом высокая концентрация специфических IgG через

продолжительный период времени после заболевания может свидетельствовать как о хроническом течении заболевания, так и о повторной инфекции. Как был интерпретирован данный результат? Возможно ли повторное заражение людей, проживающих на эндемичных для лихорадки Эбола территориях?

Следующий вопрос касается сокращений: зачем в «Список использованных сокращений» были включены такие термины, как антиген (АГ), диагностическая информативность (ДИ), диагностическая эффективность (ДЭ) и природный антиген (ПА), если они не были использованы? Также, на мой взгляд, в таблицах 1 и 3 автор излишне использовал одновременно полное название страны Демократическая Республика Конго и аббревиатуру ДРК.

В целом диссертация и автореферат написаны хорошим научным языком, но есть несколько редакционных замечаний. В тексте диссертации на стр. 10, 13, 55 и в таблицах 1 и 3 слово «Республика» в официальных названиях стран Гвинея Республика и Демократическая Республика Конго автор написал с прописной буквы. Ошибки в пунктуации и нарушения синтаксических норм сделаны автором на стр. 46 «Вестерн-блот, как правило не имеет бэнда...» и «...это неопределимо для исследования протективных свойств содержащих антитела образцов но обедняет выявляемый репертуар...», на стр. 84 «Это определило процедуру ИФА – непрямой твердофазный» и «Для выяснения диагностической эффективности набора реагентов такого дизайна и валидации его диагностических и аналитических характеристик была сформирована рабочая панель из пяти содержащих специфические антитела сывороток крови реконвалесцентов, и из пяти сывороток крови людей не содержащих специфических антител, использована отделом биологического и технологического контроля (ОБТК)...», и на стр. 99 «Вакцинация добровольцев вакциной вызвала наработку специфических антител...».

**Заключение.** Диссертационная работа Пьянкова Степана Александровича «Иммуноферментная диагностика лихорадки Эбола: эффективность применения природного антигена для выявления специфических антител» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой. Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертации нет, а вышеперечисленные замечания носят редакционный характер и не снижают научно-практическую значимость и актуальность работы. В представленной работе решен ряд научно-практических проблем, связанных с изучением заболевания, вызванного особо патогенным вирусом Эбола; разработан диагностический набор для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин», который зарегистрирован в Российской



Федерации и апробирован в полевых условиях при эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике в 2015 г.

Диссертационная работа Пьянкова С.А. полностью соответствует критериям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции от 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по двум специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.06 – биотехнология.

Официальный оппонент,  
К.б.н., научный сотрудник  
лаборатории Молекулярной микробиологии  
ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)»  
630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8  
Телефон: +7 (383) 363-51-50  
E-mail: [ezhr@niboch.nsc.ru](mailto:ezhr@niboch.nsc.ru)

Жираковская Елена Владимировна

Подпись Жираковская Е.В. удостоверяю  
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН.  
К.х.н.  
26.05.2020



Пестряков П.Е.