

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Беклемишева Анатолия Борисовича
на диссертационное исследование ПЬЯНКОВА Степана Александровича
«Иммуноферментная диагностика лихорадки Эбола: эффективность применения
природного антигена для выявления специфических антител»,
представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия в связи с прогрессом в области разработок средств специфической диагностики и терапии инфекционных заболеваний наблюдается тенденция к снижению их доли в общем показателе причин высокой смертности у людей. Основными причинами на сегодняшний день, по которым сохраняется высокий уровень смертности от инфекций, являются рост численности населения, прежде всего на территориях Юго-Восточной Азии, Африки и Восточного Средиземноморья, урбанизация, рост числа инфекционных болезней, вызываемых неизвестными ранее патогенами, усиление резистентности патогенов, связанной как с их естественной, так и направленной человеком генетической изменчивостью, завоз возбудителей инфекций на неэндемичные территории вследствие миграций населения, обусловленных расширяющимися экономическими и туристическими связями. Большую опасность представляет преднамеренное использование против мирного населения инфекционных агентов биотеррористами, а также разработка, накопление и потенциальная возможность применения агрессивными странами возбудителей ООИ в качестве биологического оружия.

Особую роль в инфекционной патологии человека занимают вирусы, относящиеся к I группе патогенности, летальность от которых для людей может достигать 90%. Среди них наиболее патогенными являются филовирусы марбург и эболавирусы. В последние 10 лет возникли две крупные вспышки инфекций с высоким уровнем летальных исходов, вызванных марбургвирусом (БВМ) в Анголе в 2004-2005 гг и эболавирусом (БВЭ) Заир на территории Гвинеи, Либерия, Сьерра-Леоне в 2014 году. Последняя, не смотря на всемирную поддержку, оказанную этим странам в их борьбе с Эболой, длилась более двух лет и сопровождалась завозом этой инфекции в соседние западно-африканские страны. Единичные случаи заболевания были зарегистрированы также в США и ряде стран Западной Европы.

Приоритетными задачами, стоящим перед учеными являются разработки эффективных средств диагностики, профилактики и терапии эболавирусной инфекции. В этой связи диссертационная работа Пьянкова С.А., направленная на создание эффективной системы иммунодиагностики заболеваний, вызываемых вирусом Эбола, является, несомненно, актуальным и приоритетным исследованием.

Степень разработанности темы исследования. К началу исследований соискателя были разработаны методы индикации филовирусов, основанные на визуализации цитопатических эффектов вирусов *in vitro*, а также высоко чувствительные и специфичные методы дифференциальной детекции филовирусов в исследуемых образцах,

основанные на современных молекулярно-биологических методах анализа (ПЦР, ОТ-ПЦР). В ряде развитых стран и в том числе в России были созданы и производятся наборы для обнаружения вирусов Эбола в образцах методом ОТ-ПЦР, нижний порог чувствительности которых составляет 100 – 1000 копий вируса в 1 мл образца, а специфичность приближается к 100%. Идёт постоянная модернизация этих наборов. Кроме того, было установлено, что сроки детекции IgM к БВВЭ в крови больных и обнаружения геномных РНК БВВЭ методом ОТ-ПЦР частично перекрываются. Это наблюдение открыло перспективу выявления IgM к вирусу Эбола в качестве метода диагностики, дополняющего ОТ-ПЦР и применяющегося с ранних сроков инфекции, т.е. на 4-5 сутки после появления клинических признаков заболевания. Наряду с методами ПЦР-детекции РНК БВВЭ были разработаны и диагностические наборы, основанные на обнаружении специфических IgG к антигенам БВВЭ. , для контроля эффективности противоэпидемических мероприятий, например вакцинации, а также с проведением серомониторинга БВВЭ в препаратах, предназначенных для иммунотерапии и иммунопрофилактики эболавирусных инфекций. Необходимость разработки диагностических наборов, основанных на обнаружении специфических IgG, связана с необходимостью контроля эффективности противоэпидемических мероприятий, например вакцинации, а также с проведением серомониторинга БВВЭ.

Научная новизна исследования. Соискателем впервые проведено сравнение антигенных свойств адаптированного на морских свинках лабораторного штамма 8МС и актуального штамма H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 Zaire ebolavirus, которое показало их полное сходство и, таким образом, позволило создавать диагностический набор на основе инаktivированных вирионов лабораторного штамма 8МС.

Разработаны методы препаративной наработки, очистки, инаktivации и контроля отсутствия остаточной инфекционной активности препаратов вирионов штаммов 8МС и H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 Zaire ebolavirus, позволяющие получить антиген, более эффективно связывающий специфические антитела чем отдельные рекомбинантные белки или синтетические пептиды.

Оригинальными являются и данные, свидетельствующие о том, что при использовании диагностического набора на основе иммуносорбента, приготовленного из штамма 8МС продолжительность выявления специфических антител в крови больных лихорадкой Эбола и реконвалесцентов расширена до двух лет.

Таким образом в результате выполнения диссертационной работы соискателем получены принципиально новые данные, касающиеся стратегии получения средств иммунодетекции антител классов G и M в образцах сыворотки и плазмы крови на основе природного, инаktivированного, очищенного вириона Эбола Заир и их применимости как для иммунодиагностики лихорадки Эбола, так и для серомониторинга БВВЭ и характеристики разрабатываемых средств иммунопрофилактики и иммунотерапии этой инфекции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Диссертантом впервые в России разработан и в установленном порядке зарегистрирован в Российской Федерации «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» по ТУ 9398-60-05664012-2015» (Регистрационное

удостоверение №РЗН 2015/3458 от 21.12.2015 г., Приложение 1), на основе иммуносорбента с очищенным инактивированным антигеном из вирионов штамма 8МС Zaire ebolavirus. Диагностический набор был апробирован в ходе вспышки БВВЭ в Гвинейской Республике в 2015 году и показана его эффективность для иммунодиагностики инфекции Эбола.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Диссертационная работа Пьянкова С.А. представляет собой большое по объёму разноплановое исследование с использованием современных методов анализа высоко патогенных вирусов. Достоверность результатов работы определяется применением современных вирусологических, цитологических, культуральных, молекулярно-биологических методов исследования вирусов и методов статистического анализа полученных результатов. В работе соискатель использовал два штамма эболавируса Заир, подлинность которых была подтверждена им с помощью определения чувствительности к штаммам нечеловеко-образных приматов *Macaca fascicularis* при внутримышечном заражении, размножением вируса на монослое клеток Vero с регистрацией характерного цитопатического действия и электронномикроскопической визуализацией филовirusа в препаратах. Для подтверждения подлинности штаммов использовался также вестерн-блот анализ штаммов с охарактеризованными образцами крови реконвалесцентов, а также метод ОТ-ПЦР на зарегистрированных в установленном порядке медицинских изделиях для выявления РНК эболавируса.

Все работы с живым вирусом соискатель проводил в строгом соответствии с требованиями санитарных правил безопасности работ с микроорганизмами I-II групп патогенности, в условиях максимально изолированной лаборатории, соответствующей международному уровню BSL-4. Культивирование вируса осуществлялось на культуре клеток Vero, а также с использованием инфицированных ВЭ обезьян. Инфекционную активность эболавируса Заир определяли до и после инактивации путем пассажей на культуре клеток Vero и лабораторных животных. Выделение и очистку вируса из клеток Vero и печени инфицированных погибших обезьян соискатель проводил с использованием адекватных этой задаче биохимических методов (дифференциальное центрифугирование, осаждение вируса ПЭГ 8000 и центрифугирование в градиенте плотности сахарозы). Идентификация вируса во фракциях градиента осуществлялась с применением электронной микроскопии и электрофореза в SDS-ПААГ, Вестерн-блот анализа с образцами сыворотки от реконвалесцентов после БВВЭ.

На этапе выбора антигена для разработки средства иммунодиагностики, соискатель проводил сравнение диагностической эффективности разных антигенов. Оценка диагностической эффективности создаваемого набора реагентов проводилась им в сравнении с референс-диагностикумами. Достоверность полученных результатов оценивалась с применением адекватных методов статистического анализа.

Работа выполнялась на панели образцов сывороток и плазмы крови человека, содержащих и не содержащих антитела к эболавирусу Заир, и предоставленных коллективами специалистов из ГНЦ ВБ «Вектор» и специализированной противоэпидемической бригадой Роспотребнадзора в Гвинейской республике. Критерием отнесения образцов к той или иной группе являлся диагноз донора при выявлении

специфических анализов в крови. Для сравнительного исследования природного антигена с известными ранее, в исследовании использовались наряду с образцами сывороток и плазмы человека, образцы сыворотки и плазмы крови нечеловекообразных обезьян, кроликов, морских свинок и моноклональные антитела мыши к эпитопам белков VP40 и GP эболавируса Заир. Образцов с содержанием и без содержания антител к эболавирусу Заир человеческого происхождения использовано 871. От животных в ГНЦ ВБ «Вектор» получено 359 образцов сывороток и плазмы крови животных.

Основные результаты диссертационной работы Пьянкова С.А. были многократно апробированы на российских научных конференциях (7 тезисов) и опубликованы в 11-ти научных статьях: в 2-х зарубежных журналах и 9-ти отечественных журналах перечня ВАК, а также в 4-ёх научных монографиях. Диссертант является соавтором 6-ти патентов РФ.

Всё выше изложенное свидетельствует о высоком профессиональном и методическом уровне исследования. Большой объем экспериментального материала и использование адекватных статистических методов анализа при исследовании диагностической эффективности созданного набора, а также теоретическое обобщение полученных данных позволили автору сформулировать основные научные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывают сомнений.

Соответствие содержания и оформления диссертации требованиям ВАК.

Диссертационная работа Пьянкова С.А. оформлена в соответствии с Национальным стандартом РФ (ГОСТ Р 7.0.11-2011), изложена на 150 страницах машинописного текста, имеет общепринятую структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, главы собственных исследований и их обсуждений, выводов, списка работ, опубликованных по теме диссертации, списка использованной литературы, включающего 222 источника, в т.ч. 21 отечественных и 201 зарубежных авторов, и 6-ти приложений. Работа хорошо иллюстрирована и включает 11 таблиц и 14 рисунков.

Во "Введении" диссертации в краткой форме изложено состояние проблемы в области изучения инфекций у человека, вызываемых филовирусами и, в частности, вирусами рода *Ebolavirus*, а также методов их диагностики. Показана актуальность диссертационного исследования и ясно сформулированы цель и задачи исследования.

Глава «Обзор литературы», состоит из 2-х разделов. В 1-м приводятся общие сведения о вирусах рода *Ebolavirus* и их эпидемиологии, включающие: систематическое положение рода и входящих в него видов; географическое распространение представителей рода; жизненный цикл и структурно-функциональные свойства вирусов рода *Ebolavirus*; детально описаны классические и современные средства диагностики лихорадки Эбола.

Во втором разделе приводятся рекомендации ВОЗ по предупреждению эпидемий вызываемых филовирусами, проведению санитарно-эпидемиологических мероприятий при возникновении вспышки заболеваний, вызываемых вирусами Эбола. Приведены и рекомендации по применению средств иммунодиагностики при разработке терапевтических и вакцинных препаратов против инфекции Эбола.

В целом прочтение этой главы позволяет получить полную информацию о современном состоянии вопросов, связанных с распространением филовирусов в странах Африки, случаев регистрации вызываемых ими инфекций в Европе и США, особенностях патогенеза инфекций и их диагностики. Глава написана хорошим литературным языком и при её прочтении обращает на себя внимание широкая эрудиция диссертанта в этих вопросах.

В главе «Материалы и методы» детально описаны использованные в работе методы исследования, включающие современные вирусологические, цитологические, культуральные, молекулярно-биологические исследования вирусов и методы статистического анализа полученных результатов. Работы проводились как на культурах клеток, так и на различных видах животных: аутбредных морских свинках породы Hartley, кроликах породы шиншилла, мышах линии BALB/c, на самцах обезьян *Macaca mulatta* и *Papio hamadryas*, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор».

В главе «Результаты и обсуждение» изложены результаты собственных исследований автора. Материалы этой главы изложены детально и последовательно, всесторонне проанализированы и обсуждены. Экспериментальные данные хорошо иллюстрированы 14 рисунками и 11 таблицами, что облегчает восприятие текста. В методическом отношении экспериментальная работа выполнена безукоризненно. Полученные результаты позволили диссертанту сделать вполне обоснованные выводы.

В заключении обобщены основные результаты исследований. Полученные соискателем данные достоверны, выводы корректны, обоснованы и логически вытекают из полученных соискателем результатов. Автореферат достаточно полно и адекватно отражает содержание диссертации. Диссертация изложена хорошим литературным языком и легко воспринимается.

В целом Пьянковым С.А. на обширном экспериментальном материале выполнена объёмная и очень интересная и важная как в научном, так и в практическом отношении работа. При прочтении диссертации обращает на себя внимание глубокое и всестороннее знание соискателем научной литературы по изучаемой проблеме. Следует отметить и высокую методическую подготовку диссертанта, который при решении поставленных задач использовал, как уже отмечалось выше, широкий арсенал современных методов исследования, удовлетворяющих решению поставленных задач.

Таким образом, диссертационная работа Пьянкова С.А. как по содержанию, так и по оформлению соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Результаты, полученные соискателем при изучении двух видов вируса Эбола Заир могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на создание средств иммунодиагностики инфекций, вызываемых Эбола вирусами, а также средств контроля эффективности вакцинопрофилактики и терапии этой инфекции. Материалы диссертации целесообразно включить в соответствующие курсы лекций по вирусологии и биотехнологии для студентов биологических и медицинских ВУЗов, врачей факультетов усовершенствований последипломного образования.

Общие замечания по диссертационной работе. Ранее, на стадии рецензирования работы мною были сделаны замечания, касающиеся оформления работы, которые учтены в конечном варианте диссертации. В тексте диссертации встречаются отдельные опечатки, орфографические, синтаксические и стилистические ошибки. Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет.

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о присуждении ученых степеней. Диссертация Пьянкова Степана Александровича «Иммуноферментная диагностика лихорадки Эбола: эффективность применения природного антигена для выявления специфических антител» представляет собой завершенное оригинальное научное исследование. Работа выполнена под руководством доктора биологических наук, Агафонова Александра Петровича, и является самостоятельным научно-квалификационным исследованием, проведенным на высоком научно-методическом уровне, в котором получен фактический материал и содержится решение научной задачи – разработка набора реагентов для высокочувствительного и специфичного иммунодиагностического скрининга БВВЭ, что имеет существенное значение для решения широкого спектра исследовательских и прикладных задач вирусологии. Практическая значимость работы заключается в применимости разработанного набора как для иммунодиагностики лихорадки Эбола, так и для серомониторинга БВВЭ и характеристики разрабатываемых средств иммунопрофилактики и иммунотерапии этой инфекции. Диссертационное исследование по актуальности, методическому уровню, значимости полученных результатов, выводов и полноте их опубликования отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученой степени» (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а Пьянков Степан Александрович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Беклемишев А.Б.

Дата (02.06.2020 г.)

Подпись



Адрес: 630060, Новосибирск,
ул. Тимакова, д.2; <https://frcftm.ru/>

Подпись Беклемишева А.Б. удостоверяю

Начальник отдела кадров
ФИЦ ФТМ

