

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Пьянкова Степана Александровича**

«Иммуноферментная диагностика лихорадки Эбола: эффективность применения природного антигена для выявления специфических антител», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.02.02 – вирусология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Изучение свойств высокопатогенных вирусов и создание высокочувствительных тест-систем для диагностики геморрагических лихорадок, таких как лихорадка Эбола, является **актуальной** проблемой в:

- вирусологии - при изучении эволюции патогенов;
- медицине - при дифференциальной диагностике заболевания у человека, для оценки специфической активности разрабатываемых и серийно выпускаемых препаратов. Изучение фундаментальных механизмов, возникновения, развития, а также иммунного ответа организма на инфекцию позволяет определить стратегию борьбы с заболеванием;
- биотехнологии – при производстве и контроле качества крупномасштабных производств средств профилактики и терапии. В результате приоритет отдается наиболее надежным методам диагностики.

В области мониторинга иммунного ответа находят широкое применение средства диагностики на основе иммуноферментного анализа (ИФА). Метод имеет высокую чувствительность, специфичность, скорость получения результатов, а также характеризуется низкими материальными и временными затратами.

Целью работы являлось изучение культуральных свойств штаммов вируса Эбола, чтобы выбрать оптимальный для получения цельновирионных антигенов, разработать на их основе набор реагентов для выявления антител к вирусу Эбола и определить диагностическую эффективность разработанного набора для решения широкого спектра исследовательских и прикладных задач вирусологии.

Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение), выводы, список используемой литературы. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 11 таблицами. Список литературы включает 222 литературных источника, из них 20 источников отечественной и 202 источника зарубежной литературы.

Для достижения поставленной цели автору потребовалось решить следующие задачи:

1. Выявить антигенные различия штаммов Zaire ebolavirus 8MC и H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022.
2. Оптимизировать схему получения препаративных количеств Zaire ebolavirus штаммов 8MC и H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 при культивировании на монослое инфицированных клеток и заражении восприимчивого животного. Разработать технологию концентрирования и очистки цельновирионного антигена с контролируемым отсутствием инфекционности после инактивации.
3. Сравнить диагностическую эффективность использования очищенных инаktivированных антигенов, приготовленных из штаммов 8MC и H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022, с эффективностью применения рекомбинантного и пептидного антигенов при постановке ИФА.

4. На основе антигена, обеспечивающего максимальные показатели чувствительности, специфичности и серийной производительности, разработать и зарегистрировать в качестве медицинского изделия набор реагентов для иммунодиагностики БВВЭ.

5. Определить информативность результатов применения набора реагентов при диагностике БВВЭ, оценке величины гуморального иммунитета и изучении специфической активности иммунобиологических препаратов для профилактики и терапии лихорадки Эбола.

В ходе выполнения работы автором:

1. Показано отсутствие антигенных особенностей адаптированного на морских свинках лабораторного штамма и актуального штамма.

2. Отработана оптимальная схема получения препаративных количеств вируса с использованием как культуры клеток, так и восприимчивых животных.

3. Разработаны методы очистки, инаktivации и контроля отсутствия остаточной инфекционной активности препаратов на основе актуального и лабораторного штаммов, позволяющие получить антиген, более эффективно связывающий специфические антитела чем отдельные рекомбинантные белки или синтетические пептиды.

4. Показана возможность расширения до двух лет продолжительности выявления специфических антител в крови больных лихорадкой Эбола и переболевших при использовании цельновирионного антигена.

5. Показана эффективность использования диагностического набора на основе антигена из лабораторного штамма для выявления антител к единичным эпитопам актуального штамма вируса при оценке специфической активности полиэпитопной вакцины «ЭпиВакЭбола».

6. Теоретическая и практическая значимость работы. Запатентована технология получения очищенного инаktivированного антигена. Показана возможность его использования в качестве основного компонента тест-системы. Антиген эффективно связывает в иммунологических реакциях специфические антитела против возбудителя лихорадки Эбола.

7. Выявленная антигенная идентичность штаммов позволила без потери чувствительности анализа применить более продуктивный антиген в тест-системе.

8. Утверждена и внедрена в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора стандартная операционная процедура на производство цельновирионного концентрированного очищенного инаktivированного антигена вируса Эбола», информативность диагностики с применением антигена подтверждена двумя методами.

9. Впервые в России разработан и зарегистрирован набор реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» на основе очищенного инаktivированного антигена. Он применен в 2015 году в ходе вспышки лихорадки Эбола в Гвинейской Республике.

10. Выпущено 6 серий тест-системы, выполнено около 6 000 анализов.

11. Получен патент РФ на производство антигена для тест-системы.

Таким образом, в работе достигнута поставленная цель. Автор изучил культуральные свойства штаммов вируса Эбола, выбрал оптимальный для получения цельновирионного антигена, разработал на его основе набор реагентов ИФА для выявления антител к вирусу Эбола и определил диагностическую эффективность ИФА для решения таких задач вирусологии и медицины, как диагностика лихорадки Эбола и сравнительная оценка эффективности препаратов против возбудителя.

Практическая направленность работы не вызывает сомнений. Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается:

- общепризнанными положениями вирусологии и медицины;
- публикациями в научных журналах и представлением полученных результатов на научных конференциях;
- совпадением экспериментальных результатов с теорией.

Считаю целесообразным продолжить работу по созданию тест-систем для диагностики опасных заболеваний на основе цельновирионных антигенов возбудителей.

В целом автореферат производит хорошее впечатление. Автореферат составлен с соблюдением установленных требований, изложен логично и аргументировано.

В качестве недостатков автореферата можно отметить:

- избыточный объем введения;
- отсутствие описания импортных ИФА-препаратов сравнения в разделе материалы и методы;
- не описана погрешность измерения «идентичных» - по тексту, объемов и концентраций фракций антигенов из разных штаммов, не приведены величины концентрации антигенов в размерности СИ;
- нет расшифровки при первом упоминании некоторых аббревиатур (ИХА, РН, НЧП и т.д.), которая вероятно присутствует в тексте диссертации, но не перенесены в автореферат, что затрудняет восприятие работы.

Указанные замечания не влияют на достоверность результатов и обоснованность сделанных выводов.

Учитывая объем представленных исследований их новизну, практическую значимость и достоверность, считаю, что диссертационная работа **Пьянкова Степана Александровича** соответствует п.9 “Положения о присуждения ученой степени”, утвержденного Постановления Правительства Российской Федерации, а соискатель заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.02.02 – вирусология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Доктор технических наук,
ведущий научный сотрудник,
отдела биофизики и экологических исследований,
ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» Роспотребнадзора.
630559, Новосибирская область р.п. Кольцово.
Тел. 8 913 452 60 73. E/ mail general@vector.nsc.ru.
Подпись В.М. Генералова заверяю
Ученый секретарь
ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» Роспотребнадзора
кандидат биологических наук




В.М. Генералов

03.06.2020


О.А. Плясунова

03.06.2020