



МИНИСТЕРСТВО ОБОРОНЫ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБОРОНЫ РОССИИ)
ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
**48 ЦЕНТРАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ**
г. Сергиев Посад-6,
Московская область, 141306

«22» мая 2020 г. № _____



УТВЕРЖДАЮ

Начальник ФГБУ «48 ЦНИИ»

Минобороны России

д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН

С.В.Борисевич

«22» мая 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
на диссертацию Пьянкова Степана Александровича на тему:
«Иммуноферментная диагностика лихорадки Эбола: эффективность применения
природного антигена для выявления специфических антител»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертация посвящена актуальной научно-практической задаче по разработке средств диагностики лихорадки Эбола на основе выявления специфических антител в иммуноферментном анализе. Вирус Эбола является наиболее опасным среди возбудителей вирусных инфекционных заболеваний. Болезнь, вызываемая вирусом Эбола, протекает в тяжелой форме с выраженным геморрагическим синдромом с высоким процентом летальных исходов. До 2014 года было зарегистрировано более 35 вспышек лихорадки Эбола и отдельных случаев инфицирования человека. Общее количество больных за этот период составило 2433 человека, из которых 1581 погиб. После 2000 года время между вспышками начало сокращаться, а уровень заболеваемости возрос. Эпидемия лихорадки Эбола в Западной Африке 2014-2016 годов на территории Гвинеи, Сьерра-Леоне и Либерии является самой крупной за историю наблюдений по количеству заболевших и площади распространения. Впервые вспышка затронула крупные города с международными аэропортами, что вызывала угрозу распространения заболевания на другие континенты. Было зарегистрировано более 27 тысяч заболевших, при этом общая летальность составила 40,5 %. Таким образом, хотя заболевания, вызываемые филовирусами, эндемичны для стран африканского региона, возрастание периодичности новых крупных вспышек лихорадки Эбола, широкое развитие международных транспортных и пассажирских перевозок увеличивает риск завоза и

распространения филовиральной инфекции на эндемической территории, в том числе и на территории Российской Федерации.

Лабораторную диагностику болезни, вызываемой вирусом Эбола, проводят с помощью полимеразной цепной реакции с целью выявления РНК вируса, а также иммуноферментного или иммунохроматографического анализа для выявления специфических антигенов и антител. Иммуносерологические методы определения антител к вирусу Эбола классов IgM и IgG представляют возможность проводить лабораторную диагностику на более поздние сроки от начала заболевания и осуществлять ретроспективную диагностику и серологический эпидмониторинг в эндемичных очагах. Учитывая, что появление антител класса IgM, происходит уже на 5 сутки от начала заболевания, использование иммуносерологических методов возможно и для постановки первичного диагноза в комплексе с полимеразной цепной реакцией. В отсутствие зарегистрированных в Российской Федерации изделий медицинского назначения, предназначенных для выявления специфических антител к вирусу Эбола, диссертационная работа С.А.Пьянкова направлена на решение актуальной научно-практической задачи, имеющей значение для совершенствования лабораторной диагностики лихорадки Эбола.

Научная новизна результатов исследований диссертационной работы заключается в том, что впервые было доказано отсутствие антигенных особенностей адаптированного на морских свинках лабораторного штамма 8MC и актуального штамма H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 *Zaire ebolavirus*. Выбранные методы культивирования штаммов 8MC и H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 *Zaire ebolavirus*, концентрирования, очистки, инактивации и контроля отсутствия остаточной инфекционной активности препаратов на их основе, позволили получить антигены, которые более эффективно связывали специфические антитела по сравнению с отдельными рекомбинантными белками или синтетическими пептидами (аналога белка VP40 и синтетических полипептидных аналогов двух доменов белка GP вируса Эбола). Показана возможность расширения до двух лет продолжительности выявления специфических антител в крови больных лихорадкой Эбола и реконвалесцентов при использовании разработанного диагностического набора на основе иммуносорбента, приготовленного из штамма 8MC *Zaire ebolavirus*. Данный набор реагентов был успешно применен для выявления антител к единичным эпитопам *Zaire ebolavirus* при оценке специфической активности полиэпитопной вакцины «ЭпиВакЭбола».

Новизна результатов, полученных автором, подтверждена патентом на изобретение № 2631937 «Штамм вируса Эбола Заир H.sapiens-wt/GIN/2015/Kalidie-Kindia-1022 для получения антигена, используемого в качестве компонента иммуноферментной тест-системы для выявления антител классов G и M к вирусу Эбола».

Теоретическая и практическая значимость результатов исследований заключается в разработке и патентовании технологии получения очищенного инактивированного антигена на основе выделенного в 2015 году от больного во время эпидемии в Гвинейской республике штамма

H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 Zaire ebolavirus. Показана возможность его использования в качестве основного компонента набора реагентов для лабораторной диагностики. Доказано, что антиген эффективно связывает в иммунологических реакциях специфические антитела из крови больных болезнью, вызываемой вирусом Эбола, реконвалесцентов и вакцинированных против лихорадки Эбола.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что утверждена и внедрена в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора стандартная операционная процедура СОП № 3-020/01-15 «Производство цельновирсионного концентрированного очищенного инактивированного антигена вируса Эбола» для изготовления диагностических препаратов, разработана и утверждена нормативно-техническая документация на «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» по ТУ 9398-60-05664012- 2015», зарегистрированного установленным порядком в Российской Федерации (регистрационное удостоверение № РЗН 2015/3458 от 21.12.2015 г.)

Достоверность основных положений и выводов диссертации подтверждается результатами экспериментов, которые были апробированы на международных и всероссийских конференциях. По материалам исследований опубликовано 22 научных работы, в том числе 11 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для опубликования основных результатов диссертации. Основные положения диссертационной работы, выводы и рекомендации полностью соответствуют поставленным задачам исследования и базируются на применении современных вирусологических, иммунологических, молекулярно-биологических методов исследования и стандартных статистических методик обработки полученных результатов, использовании разработанной репрезентативной панели образцов сыворотки и плазмы крови человека и животных, содержащих и не содержащих антитела к *Zaire ebolavirus*, общее количество которых составило 1230 проб. Достоверность исследования также подтверждается многоцентровой процедурой регистрации медицинского изделия - «Набора реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» по ТУ 9398-60-05664012- 2015».

Структура и содержание диссертации. Диссертация состоит из введения, основной части (в которую входят три главы), выводов, библиографического списка из 222 наименований и 6 приложений. Работа содержит 14 рисунков и 11 таблиц. Введение отражает актуальность диссертационного исследования, цель, задачи, область исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту, сведения об апробации работы.

Заслуживает внимания выполненный автором диссертации подробный обзор современных сведений об эпидемиологии возбудителя лихорадки Эбола и его структурно-функциональных свойствах. Проведена систематизация классических и современных средств диагностики лихорадки Эбола. Однако, на

наш взгляд, соискатель незаслуженно обошел вниманием успехи, которые были достигнуты за последнее время в области разработки иммунохроматографических тестов для определения антигена вируса Эбола, обосновывая это тем, что «выявление антигенов вируса Эбола не имеет практических успехов». Ссылка автора на публикации [Walker et al. 2015, Broahurst et al., 2015] наоборот показывает, что разработанные и апробированные в условиях эпидемической вспышки в Либерии и Сьерра-Леоне иммунохроматографические тесты «ReEBOV» и «DSTL EVD RDT» для выявления антигена белка VP40 вируса Эбола обладают высокой чувствительностью и позволяют выявлять антиген во всех пробах, подтвержденных в полимеразной цепной реакции как положительные.

В ходе выполнения работы автор использовал широкий спектр методов вирусологического, молекулярно-генетического, иммунологического, иммунохимического анализа. Все методы достаточно подробно описаны в главе «Материалы и методы». Далее соискатель подробно излагает этапы получения и изучения антигенных различий штаммов 8MC и H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 *Zaire ebolavirus*, исследования по оптимизации технологии культивирования, концентрирования и очистки препаратов количеств природного цельновирионного инактивированного антигена вируса Эбола на основе штаммов 8MC и H.sapiens/GIN/2015/Makona-Kindia1022 *Zaire ebolavirus*, оценки их диагностической эффективности в сравнении с рекомбинантными антигенами при постановке ИФА. Автор обосновал выбор антигена, обеспечившего максимальные показатели чувствительности, специфичности и серийной производительности, на основе которого был разработан и зарегистрирован в Российской Федерации в качестве медицинского изделия набор реагентов для выявления антител к вирусу Эбола класса IgM и IgG «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин».

Особенно необходимо отметить, что автором в ходе диссертационного исследования впервые в Российской Федерации получена репрезентативная выборка сывороток больных и реконвалесцентов лихорадки Эбола, на основе которой сформированы две панели для изучения диагностической эффективности разработанного набора реагентов. Наличие панели сывороток больных позволило провести клинические испытания и подтвердить диагностическую эффективность разработанного набора реагентов. Однако, к сожалению, автор диссертации не приводит информацию, каким образом была обеспечена стабильность полученной панели сывороток и плазмы крови больных и реконвалесцентов.

На заключительном этапе исследований соискатель изучил эффективность применения набора реагентов при диагностике болезни, вызываемой вирусом Эбола, и оценил возможность использования разработанного набора для оценки средств вакцинации по гуморальному ответу и лечебных средств на основе вируснейтрализующих антител по их специфической активности.

Работа написана доступным, понятным языком, содержание диссертационной работы обладает внутренним единством и подчинено единой цели и задачам исследования. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Методические подходы получения инактивированного концентрированного очищенного антигена вируса Эбола могут быть использованы для создания диагностических средств, основанных на других принципах анализа. Полученную диагностическую панель сывороток крови больных и реконвалесцентов целесообразно использовать для проведения клинических испытаний новых диагностических средств при проведении процедуры регистрации медицинского изделия. Разработанный «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» может быть использован для диагностики болезни, вызываемой вирусом Эбола, начиная с 5-7 суток от начала заболевания в комплексе с молекулярно-биологическими методами, а также для ретроспективной диагностики в течение 2 лет после перенесенного заболевания и серологического эпидмониторинга в эндемичных очагах. Показана возможность использования разработанного набора реагентов для оценки эффективности средств вакцинации по гуморальному ответу и лечебных средств на основе вируснейтрализующих антител по их специфической активности. Набор реагентов «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» также может быть использован как референс-препарат сравнения при проведении научно-исследовательских работ, направленных на создание и изучение новых диагностических средств на основе выявления антител к вирусу Эбола.

Замечания по диссертационной работе

В ходе ознакомления и изучения разделов диссертационной работы возникли следующие замечания и вопросы для обсуждения:

1. Утверждение автора о том, что выбранный способ получения и инактивации вирусного антигена не влияет на чувствительность и специфичность выявления антител требует дополнительного пояснения, так как в диссертации не приведены экспериментальные результаты сравнения чувствительности и специфичности иммуноферментного анализа при использовании антигена до и после инактивации.

2. Судя по разделу «Материалы и методы» в распоряжении соискателя находились препараты сравнения для выявления антител к вирусу Эбола класса IgM и «Human Anti-ZEBOV ELISA Kit GP IgM» и класса IgG «Human Anti-ZEBOV ELISA Kit GP IgG» (Alpha Diagnostic Int., США), однако в экспериментальной части в сравнительном анализе на панели сывороток использована только одна тест-система для выявления антител класса IgG, что требует пояснения автора диссертации.

3. Рекомбинантные белки, полученные в различных лабораториях, могут значительно отличаться по своим свойствам, поэтому при обосновании преимущества использования цельновирионного инактивированного антигена целесообразно провести сравнение не только с отдельным рекомбинантным

аналогом VP40 *Zaire ebolavirus*, но и с другими коммерческими препаратами данного белка или с готовыми иммуноферментными наборами реагентов на его основе. В частности, Alpha Diagnostic International также выпускает и реализует как отдельные белки, так и наборы реагентов для выявления человеческих антител к вирусу Эбола IgM и IgG на основе рекомбинантных белков VP40 и NP.

4. Полученные автором результаты изучения цельновирионного природного антигена в сравнении с рекомбинантными аналогами, представленные в таблице 7 и свидетельствующие о более высокой специфичности природного антигена, идут в противоречие с другими многочисленными исследованиями и современными представлениями в области разработки иммуноферментных наборов реагентов и иммунохроматографических тестов. Поэтому в ходе дискуссии хотелось бы услышать мнение автора диссертации по данному вопросу.

5. Результаты, представленные в таблице 9, позволяют косвенно подтвердить, что применение разработанного автором набора реагентов позволяет увеличить до 2 лет период детекции специфических антител к вирусу Эбола по сравнению с набором реагентов на основе гликопротеина GP, но данное утверждение в отношении белка VP40 вызывает определенные сомнения, так как экспериментальные данные по сравнению выявляемых титров антител отсутствуют.

6. К сожалению, в экспериментальной части диссертации отсутствуют исследования по оценке чувствительности и специфичности разработанного набора реагентов при выявлении антител к другим видам вирусов рода *Ebolavirus*, в первую очередь *Sudan ebolavirus* и *Bundibudgio ebolavirus*, которые также способны вызвать крупную вспышку заболевания с высокой летальностью. Полагаем, что соискатель в ходе обсуждения диссертации должен пояснить, почему не были проведены данные исследования и планируются ли они в дальнейшем.

7. При оформлении диссертации имеются отступления от ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации», а также отдельные орфографические и синтаксические ошибки. В частности, во введении отсутствует обязательный структурный элемент «Степень разработанности темы диссертации». Отсутствует раздел «Заключение», который ошибочно включен в основную часть. В самом заключении, как и в выводах, отсутствуют рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Библиографические ссылки необходимо оформлять в соответствии с ГОСТ Р 7.0.5, который требует указывать по тексту порядковый номер ссылки в квадратных скобках при наличии нумерации в затекстовом списке литературы.

В целом, отмеченные недостатки не снижают научную ценность диссертации, которая подтверждается регистрацией «Набора 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.), и не влияют на общую положительную оценку представленной работы.

Заключение. Диссертация Пьянкова Степана Александровича на тему: «Иммуноферментная диагностика лихорадки Эбола: эффективность применения природного антигена для выявления специфических антител», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная научная задача, имеющая значение для практического здравоохранения Российской Федерации, и соответствует пунктам 9-11, 13 и 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а соискатель достоин присуждения искомой ученой степени по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв ведущей организации рассмотрен и одобрен на заседании научно-технического совета ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, протокол от 21.05.2020 г. № 5(901).

Отзыв составили:

Ведущий научный сотрудник 1 НИУ
ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
канд. мед. наук

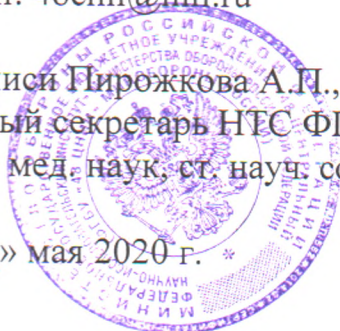
Начальник 5 НИО
ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
канд. биол. наук

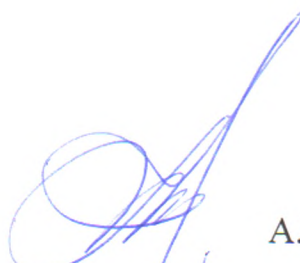
Старший научный сотрудник 3 НИО
канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

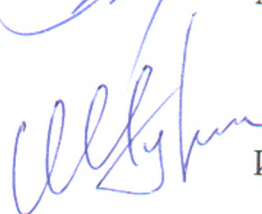
Адрес: 141306, Московская область,
г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11;
тел./факс 8(496)552-12-06;
e-mail: 48cnii@mil.ru

Подписи Пирожкова А.П., Чуркина И.А., Плехановой Т.М. заверяю.
Ученый секретарь НТС ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
канд. мед. наук, ст. науч. сотр.

«22» мая 2020 г.




А.П.Пирожков


И.А.Чуркин



Т.М.Плеханова



В.П.Краснянский