

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора, академика РАН Борисевича Сергея Владимировича на диссертацию Файзулоева Евгения Бахтиеровича «Биологическое разнообразие и факторы вирулентности вирусов – возбудителей вакциноуправляемых инфекций», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10 Вирусология

Глобальное распространение возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций, преобладание среди них РНК-содержащих вирусов сопряжено с их высоким уровнем генетической изменчивости. В связи с этим необходим мониторинг генетического и антигенного разнообразия возбудителей вакциноуправляемых вирусных инфекций.

Опыт массового применения вакцин против ротавирусного энтерита, папилломавирусных заболеваний и COVID-19 установил, что вакцинация защищает человека от тяжелых форм этих заболеваний, но не всегда предохраняет от инфекции и не предотвращает распространения вирусов.

Возбудителей перечисленных вирусных инфекций характеризует широкое генетическое разнообразие, тенденция к появлению новых антигенных вариантов и дивергенция в процессе эволюции под влиянием различных селективных факторов. Способность к периодическому появлению новых эпидемически значимых геновариантов вирусов определяется высокой изменчивостью вирусного генома, наличием природных резервуаров инфекции, возможностью межвидовой трансмиссии, а для ротавирусов группы А еще и сегментированным характером вирусного генома.

Таким образом, появления новых патогенных респираторных и кишечных вирусов, в том числе обладающих пандемическим потенциалом, установление факторов и детерминант их вирулентности и механизмов их модуляции, клиническая значимость и убиквитарность коронавирусов, папилломавирусов и ротавирусов группы А, а также отсутствие соответствующих вакцин в российском национальном календаре

иммунизации, определяют **актуальность данной работы**, целью которой являлась оценка генетического разнообразия возбудителей приоритетных вакциноуправляемых вирусных инфекций и создание научной основы для оптимизации диагностических наборов и профилактических вирусных вакцин.

Для достижения поставленной цели **автором были решены следующие задачи**: разработаны ОТ-ПЦР-РВ наборы реагентов для дифференциального выявления 16 возбудителей острых респираторных и кишечных инфекций, включая вирусы гриппа А и В, парагриппа (4 типов), аденовирусов, бокавирусов, респираторно-синцитиальных вирусов, риновирусов, энтеровирусов, коронавирусов, ротавирусов (групп А и С), норовирусов, саповирусов, астровирусов, полиовирусов, вирусов гепатита А и Е, ортороевирусов и вируса краснухи.

Исследована распространенность разных генотипов ротавирусов и видов коронавирусов, на территории Московской области, папилломавирусов человека высокого и низкого онкогенного риска на территории Российской Федерации.

Выявлены вероятные генетические и фенотипические маркеры аттенуации холодаадаптированного варианта отечественного штамма С-77 вируса краснухи. Кроме того, оценена вирулентность, иммуногенность и протективность *in vivo* полученных холодаадаптированных мутантов Уханьподобного штамма вируса SARS-CoV-2.

Научная новизна. Впервые разработана методика специфической ПЦР-амплификации сегментированного ротавирусного РНК-генома для последующей полногеномной характеристики ротавирусов человека методом нанопорового секвенирования. Это позволило установить ключевую роль ротавирусов группы А в госпитализации с острым гастроэнтеритом и внутрибольничного заражения в период с 2009 по 2014 гг. детей в возрасте 5 лет в условиях стационаров г. Москвы.

Впервые получены приоритетные данные о циркуляции на территории Российской Федерации всех известных сезонных коронавирусов человека. Это позволило установить, что у детей в возрасте до 5 лет коронавирусы HCoV-OC43 и HCoV-NL63 являются причиной тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

Впервые выявлен набор мутаций, возникших в процессе культивирования и адаптации вируса краснухи, штамм С-77, и Ухань-подобного штамма SARS-CoV-2 к новому «хозяину» и росту при пониженной температуре, определяющие его холодадаптированный и аттенуационный фенотип, что позволило разработать научные основы аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2, позволяющие создавать живые аттенуированные вакцины.

Научная новизна диссертации подтверждена патентами на изобретения **RU2460803 и RU2506317.**

Теоретическая значимость работы заключается в разработке принципов получения аттенуированных штаммов вируса краснухи и SARS-CoV-2, которые по своим биологическим свойствам могут рассматриваться в качестве кандидатов для разработки на их основе живой аттенуированной вакцины.

Подтвержден тезис об убиквитарности сезонных коронавирусов человека, циркулирующих в московском регионе.

Разработаны методические подходы к генетической характеристике ротавирусов, представляющие собой эффективные инструменты эпидемиологического мониторинга ротавирусной инфекции, которые могут стать основой методов контроля подлинности и специфической активности при производстве ротавирусной вакцины.

Осуществлен прогноз эффективности специфической профилактики заболевания отечественными вакцинами, вызванного папилломавирусами человека высокого и низкого онкогенного риска.

Практическая значимость работы очевидна и заключается в

разработке, апробировании и внедрении в лабораторную практику экспериментальных наборов на основе метода мультиплексного ОТ-ПЦР-РВ для этиологической диагностики острых респираторных и кишечных вирусных инфекций и генотипирования ротавирусов группы А.

Установлена этиологическая роль коронавирусов HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NCU1 в возникновении у детей в возрасте до 5 лет тяжелых респираторных заболеваний, требующих госпитализации.

Выявлена важная роль ротавирусов животных и межвидовой передачи в появлении патогенных для человека ротавирусов, имеющих эпидемический потенциал.

Определен состав распространенности генотипов папилломавирусов человека, циркулирующих на территории Российской Федерации, что позволило подойти к созданию экспериментальных образцов отечественной вакцины.

Определены факторы и маркеры аттенуации вирусов краснухи и SARS-CoV-2. Установлено, что штамм С-77 вируса краснухи в процессе культивирования в культуре клеток почки обезьян Vero приобрел аттенуационный фенотип, детерминируемый рядом уникальных мутаций, не встречающихся у диких штаммов возбудителя.

Разработаны методические подходы к выявлению маркеров аттенуации штаммов вирусов краснухи и SARS-CoV-2 в условиях *in vitro*, которые могут быть использованы для контроля стабильности фенотипа и генотипа вакцинных штаммов вирусов.

Основные научные результаты, изложенные в диссертации, представлены в виде 33 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Апробация работы проведена на 5 международных, 5 всероссийских с международным участием и 3 всероссийских научных конференциях.

В диссертации приведены **результаты, полученные лично автором** (планирование, разработка протоколов экспериментов, руководство и

постановка экспериментов) и выполненные совместно с другими сотрудниками, представленные с их согласия. Основная часть исследований выполнена на базе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Отдельные исследования проведены на базах 5 ведущих отечественных научных учреждений.

Достоверность полученных данных определяется использованием обширного комплекса современных методов исследования и статистических методов и программного обеспечения, проверкой воспроизводимости результатов в независимых экспериментах.

Совокупность новых научных положений, выносимых на защиту, обоснована приведенным по тексту теоретическим и большим экспериментальным материалом, который обуславливает и подтверждает достоверность положений, выносимых на защиту, и представленных выводов.

Выводы, сформулированные Файзуловым Евгением Бахтиеровичем корректны и в полной мере отражают суть и научную значимость результатов работы.

Работа выполнена на современном научно-методическом уровне и имеет внутреннее единство. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10 Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 6, 7, 10, 11 паспорта научной специальности.

Автореферат диссертации на 48 листах в полной мере отражает содержание диссертации.

Полученные автором результаты реализованы в виде набора реагентов «ОРВИ-Монитор», утвержденного приказом руководителя Росздравнадзора №1211-Пр/12 от 19 марта 2012 г. (регистрационное удостоверение «ФСР 2012/13218»), способов дифференциальной диагностики ОРВИ и ОКИ, нуклеотидных последовательностей видоспецифичных праймеров и зондов (патенты РФ RU2460803C2 и RU2506317C2), а также

депонированных в базу данных GenBank 160 полных и частичных последовательностей генома вирусов краснухи, ротавирусов группы А и коронавируса SARS-CoV-2.

Оценивая работу положительно, следует отметить наличие в диссертации ряда недостатков, не снижающих общего положительного впечатления об оппонируемой работе и не влияющих на ее научную и практическую значимость:

1. Автор считает, что ошибка титрования возбудителя краснухи в культуре клеток не превышает $0,2-0,5 \lg \text{ЦПД}_{50}/\text{мл}$ (стр.148). Однако опыт работы с возбудителями I-II групп патогенности свидетельствует о том, что ошибка титрования возбудителей по бляшкообразованию и оспинообразованию составляет $0,2-0,3 \lg \text{БОЕ}/\text{мл}$ и $\lg \text{ООЕ}/\text{мл}$, соответственно. Ошибка же титрования возбудителя краснухи в культуре клеток равна $1,3-1,5 \lg \text{ЦПД}_{50}/\text{мл}$.

2. Соискатель в нарушении ГОСТа 7.32-2017 по тексту диссертации вольготно меняет размер шрифта таблиц (№№ 4, 5, 11-14, 36, 38, 42, 45, 46) и рисунка (№1).

3. Диссертант по всему тексту своей работы не верно применяет очень важный термин в вирусологии (жаргон): «количество урожая вируса». Правильно говорить об уровне накопления вируса (возбудителя), но не урожая. Аналогично, это касается и жаргонного термина «... выращивание в культурах клеток животных» (стр.66). Вирусы культивируют, а не выращивают.

4. Соискатель неправильно трактует термин вирулентность (стр.44, 45, 48), которая является мерой патогенности. А, собственно патогенность, это способность возбудителя вызывать те или иные проявления заболевания в виде клинических признаков заболевания, определяемые детерминантами вирулентности.

5. Соискатель в своей работе исторически употребляет словосочетание вирус осповакцины, хотя такого возбудителя нет (согласно таксономии вирусов), а есть вирус вакцины (стр.8).

6. Автор ошибочно полагает, что методом ОТ-ПЦР-РВ он количественно определяет вирус краснухи. Однако правильно считать, что количественно выявляются копии РНК возбудителя (стр.147). Ведь не факт, что количественно выявляется жизнеспособный вирус, а не его фрагменты. При этом разница определения биологической активности, согласно автору, достигает свыше 2 lg.

7. По всему тексту диссертационной работы соискатель использует один и тот же термин в разных вариантах: вариант Омикрон, Субвариант Омикрон, геновариант Омикрон. Правильно же считать геновариант, так как геном штамма возбудителя секвенируется с последующей его характеристикой.

8. Наименования рисунка № 1 (стр.19), таблицы № 3 (стр.72) не соответствуют его их содержанию.

9. В своей работе автор допускает жаргонные и неудачные выражения и формулировки, например: «... коровьей оспы» (стр.8), «... в период с 2014 по 2009 гг.» (стр.4 и 10), «Омикрон и его потомки ...» (стр.55), «... выделение вариантов, вызывающих озабоченность» (стр.52), «...дикому вирусу...» (стр.68), «...штамма-предка...» (стр.73), «...времени сбора вирусного материала» (стр.147), «...о хорошем совпадении результатов» (стр.149).

10. Имеются не выправленные стилистические, пунктуационные ошибки и опечатки (стр. 12, 21, 28, 36, 48, 62, 83, 84, 111, 134, 143, 151, 175, 181, 192, 193, 195 и др.).

Тем не менее, указанные недостатки, в целом, не снижают общей положительной оценки диссертации.

Вывод. Диссертация Файзулоева Евгения Бахтиеровича является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных

автором исследований решена научная проблема, имеющая важное значение для обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации, в части разработки ПЦР-РВ наборов для дифференциальной диагностики 16 возбудителей острых респираторных и кишечных вирусных инфекций, а также генотипирования ротавируса группы А, коронавирусов и папилломавирусов человека.

Диссертация соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №723 от 30 июля 2014 г., №335 от 21 апреля 2016 г., № 748 от 02 августа 2016 г., № 650 от 29 мая 2017г., № 1024 от 28 августа 2017г., № 1168 от 01 октября 2018г., № 751 от 26 мая 2020г., №426 от 20 марта 2021г., №1539 от 11 сентября 2021г., №1690 от 26 сентября 2022г., №101 от 26 января 2023г., №415 от 18 марта 2023г., №1786 от 26 октября 2023г., №62 от 25 января 2024г., №1382 от 16 октября 2024г.), а соискатель Файзулов Евгений Бахтиерович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10 Вирусология.

Официальный оппонент:

Начальник федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор по специальности «Вирусология», академик РАН



Борисевич Сергей Владимирович

«07» мая 2025 г.

141306, Московская область, г.Сергиев Посад-6, ул.Октябрьская, д.11.

Тел. 8(496)552-12-00, 48cnii@mil.ru.

Подпись официального оппонента Борисевича С.В. заверяю.

Ученый секретарь научно-технического совета федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации кандидат технических наук



«07» мая 2025 г.

Савельев Сергей Валерьевич