

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Барышниковой Виктории Сергеевны на тему: «Дифференциальная серодиагностика клещевого энцефалита на основе рекомбинантных доменов белка Е», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Автореферат посвящен актуальной научно-практической задаче вирусологии и лабораторной диагностики — повышению специфичности серологического выявления антител к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) в условиях циркуляции других ортофлавивирусов. Актуальность выбранного направления не вызывает сомнений, поскольку перекрестная реактивность антител к ортофлавивирусам существенно осложняет интерпретацию результатов иммуноферментного анализа, особенно при использовании цельновирионных антигенов.

Цель исследования сформулирована четко и заключается в создании диагностической методики ИФА на основе рекомбинантных доменов белка Е ВКЭ для дифференциальной серодиагностики. Для ее достижения автором последовательно решен комплекс взаимосвязанных задач: получены рекомбинантные белки sE, dI+II и dIII; оптимизированы условия их экспрессии, солюбилизации, очистки и рефолдинга; исследованы антигенные свойства полученных белков; проведена оценка чувствительности и специфичности разработанной методики на материале лабораторных животных и человека.

Сильной стороной работы является продуманный экспериментальный дизайн и использование широкого набора биологических материалов. В исследование включены штаммы ВКЭ пяти подтипов — европейского, сибирского, дальневосточного, байкальского-1 и байкальского-2, а также сыворотки мышей, кроликов, обезьян и человека. Существенное значение имеет проверка перекрестной реактивности с антителами к вирусу Западного Нила, вирусу Омской геморрагической лихорадки, вирусу японского энцефалита, вирусу Повассан, вирусу Лангат, вирусам денге, Зика и желтой лихорадки, а также при наличии антител к вирусу Чикунгунья. Такой подход позволяет рассматривать полученные результаты не только с позиции аналитической характеристики теста, но и с точки зрения его потенциального диагностического применения.

Методическая часть исследования выполнена на современном уровне. Для получения рекомбинантных антигенов использованы молекулярно-генетические методы, бактериальная система экспрессии *E. coli*, металл-аффинная хроматография, электрофорез в ПААГ и иммуноблоттинг. Антигенные свойства белков и функциональная активность антител сопоставлялись с результатами реакции нейтрализации 50% бляшек. Важным элементом разработки является применение контрольного антигена и расчет коэффициента $OD(AG+)/OD(AG-)$, что позволяет учитывать неспецифическое связывание при интерпретации результатов ИФА.

Особого внимания заслуживают результаты, полученные при исследовании человеческих сывороток. На панели из 53 образцов от пациентов с подтвержденным клещевым энцефалитом чувствительность ИФА с рекомбинантным белком sE составила 98% (52/53),

тогда как для dIII она составила 66% (35/53), а для dI+II — 42% (3/7). При этом именно использование рекомбинантных антигенов sE и dIII позволило существенно снизить проявления перекрестной реактивности. При сравнении с коммерческими тест-системами на основе цельновирионного антигена для разработанной системы показаны 80% эффективности выявления антител и 92% специфичности против 80% и 67% соответственно для Euroimmun и 100% и 67% для «Вектор-Бест» на исследованной панели.

Научная новизна исследования состоит в получении и характеристике рекомбинантных форм белка E на основе штамма Сухар сибирского подтипа ВКЭ, а также в комплексной оценке диагностической значимости отдельных доменов белка E на широком наборе сывороток. Существенным результатом является демонстрация того, что рекомбинантный sE обеспечивает сочетание высокой чувствительности и специфичности при выявлении антител к ВКЭ и способен дифференцировать их от антител к ряду других ортофлавивирусов. Полученные данные имеют как теоретическое значение для понимания спектра антительного ответа на различные антигенные участки белка E, так и прикладное значение для совершенствования лабораторной диагностики.

Достоверность представленных результатов определяется использованием современных методов, сопоставлением данных ИФА с реакцией нейтрализации, исследованием положительных и отрицательных панелей, а также включением материалов, полученных от пациентов с различными ортофлавивирусными инфекциями и вакцинированных лиц. Положения, выносимые на защиту, логично следуют из представленных результатов, а выводы соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Работа получила апробацию на российских и международных научных мероприятиях; по теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах данных.

Замечания и вопросы.

При общей положительной оценке работы следует отметить ряд вопросов, которые целесообразно учитывать при дальнейшем развитии исследования. Во-первых, перспективным представляется расширение клинических панелей и независимая валидация методики на больших выборках, включая образцы с различными сроками заболевания и различным иммунным статусом. Во-вторых, сам автор обоснованно указывает на необходимость дополнительной оптимизации ИФА для выявления IgM, поскольку эффективность различных антигенов для этого класса антител может отличаться от результатов при определении IgG. В-третьих, для перехода от лабораторного варианта к коммерческой тест-системе потребуются исследования стабильности и условий длительного хранения рекомбинантных антигенов, а также дальнейшее расширение панели перекрестно реагирующих ортофлавивирусов. Указанные замечания носят преимущественно перспективный и рекомендательный характер и не снижают научной и практической ценности выполненной работы.

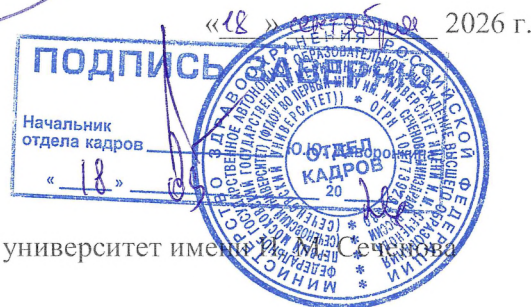
В целом автореферат производит впечатление законченного самостоятельного научного исследования, выполненного на хорошем методическом уровне. Работа характеризуется четкой постановкой задачи, последовательностью экспериментального подхода, значительным объемом исследованного материала и практической направленностью

полученных результатов. Разработанная на основе рекомбинантного белка sE методика представляет интерес как основа для дальнейшего создания более специфичной системы дифференциальной серодиагностики клещевого энцефалита.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Барышниковой Виктории Сергеевны на тему «Дифференциальная серодиагностика клещевого энцефалита на основе рекомбинантных доменов белка Е» соответствует современному уровню исследований в области вирусологии, содержит научную новизну и имеет теоретическую и практическую значимость, является законченной научно-квалификационной работой, которая полностью соответствует пунктам 7 и 10 паспорта по специальности 1.5.10. Вирусология и требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 N 723, от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168, от 20.03.2021 N 426, от 11.09.2021 N 1539, от 26.09.2022 N 1690, от 26.01.2023 N 101, от 18.03.2023 N 415, от 26.10.2023 N 1786, от 25.01.2024 N 62, от 16.10.2024 №1382, от 18.07.2026 №905 ред. от 18.07.2026 г.), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (В соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России №1 от 09.01.2020 г. (ред. от 01.03.2024 г.), необходимых для работы диссертационного совета 24.1.255.01

Профессор, и.о. Заведующего кафедрой биотехнологии,
Заведующий лабораторией генетических технологий в создании лекарственных средств
Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова
(Сеченовский Университет) (119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2)
доктор биологических наук
Костюшев Дмитрий Сергеевич
kostyushev_d_s@staff.sechenov.ru
+7 (495) 609-14-00



Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова
(Сеченовский Университет)
119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
<https://www.sechenov.ru/>