

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук
Файзулоева Евгения Бахтиеровича на диссертацию Барышниковой
Виктории Сергеевны на тему: «Дифференциальная серодиагностика
клещевого энцефалита на основе рекомбинантных доменов белка Е»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.10. Вирусология**

Актуальность исследования

Диссертационная работа Барышниковой В.С. посвящена решению актуальной научной и практической задачи медицинской вирусологии – совершенствованию серологической диагностики клещевого энцефалита (КЭ). Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) продолжает циркулировать на обширных территориях Европы и Азии, включая Российскую Федерацию, а клиническое течение инфекции может сопровождаться тяжелым поражением центральной нервной системы и стойкими неврологическими последствиями. Лабораторная диагностика имеет определяющее значение для подтверждения диагноза, дифференциации КЭ от других инфекций, проведения эпидемиологического мониторинга, а также для оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Точная серологическая идентификация антител к ВКЭ необходима для верной трактовки результатов и обоснованных клинических решений. Дифференциальная диагностика КЭ критически важна, поскольку при лабораторном подтверждении назначается специфический иммуноглобулин, который в случае неверной трактовки результата может стать причиной антителозависимого усиления инфекции при инфицировании ортофлавирусами, переносимыми комарами, такими как вирусы денге и Зика.

Традиционным подходом к серологической диагностике КЭ является применение иммуноферментного анализа (ИФА), где в качестве иммуносорбента использован нативный вирусный антиген. Так, наборах реагентов Immunozyum FSME IgG (Progen Biotechnik; штамм Neudörfl) и Anti-FSME/TBE Virus ELISA «Vienna» IgG (EUROIMMUN; штамм K23) использован цельновирионный вирусный антиген. К числу других широко изученных коммерческих систем, использующих нативный вирусный антиген, относятся Enzygnost Anti-TBE/FSME Virus IgG (Siemens) и RIDASCREEN® FSME/TBE IgG (R-Biopharm). Использование цельновирионного антигена позволяет конструировать диагностические тест-системы на основе широкого набора вирусных эпитопов, что обеспечивает оптимальную чувствительность. Вместе с тем результаты сравнительных исследований свидетельствуют о заметных различиях между коммерческими наборами реагентов, включая расхождения при исследовании одних и тех же образцов, а также обнажают проблемы чувствительности и специфичности таких ИФА тест-систем. Существенной проблемой серологических методов является перекрестная реактивность антител между представителями рода *Orthoflavivirus*. Высокая консервативность структуры белка Е ортофлавирусов способствует его

связыванию с антителами к другим ортофлавивирусам, что может приводить к ложноположительным либо спорным результатам и обуславливает необходимость применения дополнительных исследований, например, реакции нейтрализации.

Особую значимость эта проблема приобретает в связи с расширением ареалов ВКЭ, что приводит к увеличению территорий, на которых ВКЭ циркулирует совместно с вирусами Западного Нила, омской геморрагической лихорадки и другими ортофлавивирусами, а также ростом числа завозных случаев инфекций, вызываемых вирусами денге, Зика и японского энцефалита. Дополнительную сложность представляет генетическое разнообразие ВКЭ: коммерческие тест-системы, разработанные преимущественно с использованием штаммов европейского подтипа, могут неодинаково выявлять антитела к различным генетическим вариантам вируса, принадлежащих к другим подтипам, а данные для российских тест-систем отсутствуют.

Дополнительным аргументом в пользу актуальности выбранного направления является необходимость совершенствования и стандартизации антигенной основы серологических методов. Применение рекомбинантных белков позволяет получать антиген с воспроизводимыми характеристиками и целенаправленно оценивать вклад отдельных структурных областей белка Е в формирование специфического и перекрестного гуморального ответа. Для КЭ такой подход имеет особое значение, поскольку диагностическая задача включает не только выявление антител к ВКЭ, но и корректную интерпретацию результатов на фоне вакцинации и возможного иммунного ответа к родственным ортофлавивирусам. В связи с этим, сравнительное исследование различных рекомбинантных фрагментов белка Е непосредственно отвечает существующей потребности в поиске антигенов, сочетающих высокую иммунореактивность с достаточной диагностической специфичностью.

Таким образом, выбор направления исследований и актуальность темы диссертационной работы Барышниковой В.С не вызывают сомнений.

Научная новизна исследования

Научную новизну диссертации определяют разработанные автором методические подходы к повышению специфичности дифференциальной серодиагностики КЭ. В рутинной лабораторной практике основным подходом к диагностике КЭ является выявление специфических антител классов IgM и IgG методом ИФА, при этом большинство коммерческих ИФА тест-систем основано на использовании очищенного инаktivированного цельновирионного антигена ВКЭ. В диссертации для повышения специфичности серодиагностики КЭ использованы рекомбинантные антигены штаммов ВКЭ, широко распространенных на территории РФ. Исследования диагностической ценности рекомбинантных антигенов ВКЭ проводились и ранее, но они были выполнены на ограниченных панелях сывороток и предусматривали оценку перекрестной реактивности лишь с отдельными ортофлавивирусами. Достоинством работы является использование антисывороток к широкому спектру лабораторных штаммов ортофлавивирусов разных видов,

включая ВКЭ разных подтипов, а также сывороток пациентов с различными этиологическими диагнозами для определения диагностической ценности тест-системы. Установлено, что разработанный лабораторный прототип иммуноферментной тест-системы на основе рекомбинантного белка sE ВКЭ штамма Сухар позволяет дифференцировать антитела к ВКЭ от антител к другим ортофлавивирусам: вирусам Западного Нила, Лангат, Денге, Повассан, желтой лихорадки, Зика, японского энцефалита.

Существенным элементом научной новизны является последовательное сопоставление антигенов, различающихся по объему представленных эпитопов белка Е. Такой дизайн исследования позволил оценить не только пригодность каждой рекомбинантной конструкции для использования в ИФА, но и соотношение между полнотой представленного эпитопного репертуара и эффективностью выявления специфических антител. Полученные результаты показали, что уменьшение размера антигенной конструкции и исключение отдельных доменов белка Е не приводят к улучшению ее диагностических характеристик. Напротив, при исследовании сывороток человека наиболее высокая эффективность выявления антител к ВКЭ была продемонстрирована для рекомбинантного белка sE, включающего все три домена белка Е. Полученные данные имеют высокое значение для обоснованного выбора антигенной конструкции при дальнейшей разработке диагностических систем на основе рекомбинантных белков ВКЭ.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В работе проведен сравнительный анализ антигенных свойств и диагностической значимости рекомбинантных доменов белка Е (sE, dI+II, dIII) на основе штаммов Сухар (сибирский подтип, доминирующий в РФ) и Софьин (дальневосточный). Доказано, что полноразмерный sE ВКЭ обеспечивает уникальный эпитопный профиль, минимизирующий кросс-реакции. Полученные данные обосновывают приоритет конформационно-целостного антигена для выявления антител на разных стадиях инфекции. В диссертации разработан протокол очистки рекомбинантных белков, пригодный для масштабирования. Разработан лабораторный прототип иммуноферментной тест-системы для серодиагностики ВКЭ. Результаты лабораторных испытаний свидетельствуют о высокой диагностической чувствительности и специфичности тест-системы в перекрестных панелях клинических образцов. Совокупность полученных данных является основой для создания коммерческого набора реагентов, восполняющего дефицит отечественных диагностикумов с высокой прогностической ценностью.

Важным практическим аспектом является рекомбинантная природа предложенных диагностических антигенов. В отличие от получения нативного вирусного антигена, такой подход потенциально позволяет стандартизировать характеристики белкового препарата на различных этапах производства и исключить необходимость работы с инфекционным ВКЭ для накопления антигена. Разработанные в диссертации подходы к экспрессии, очистке и рефолдингу

рекомбинантных белков могут рассматриваться в качестве технологической основы для дальнейшей оптимизации лабораторного прототипа. Вместе с тем представленные результаты являются прежде всего основанием для последующей расширенной аналитической и клинической валидации, необходимой при дальнейшем переводе разработанной методики в формат диагностического набора.

Таким образом, работа представляет собой цикл исследований от фундаментального изучения антигенной структуры ВКЭ до прототипа диагностической системы, готового к клинической апробации и внедрению в эпидемиологический мониторинг РФ.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность и обоснованность научных результатов, выводов и практических рекомендаций, представленных в диссертации, обусловлены репрезентативностью исследованных выборок, комплексным применением современных аналитических методик и корректной статистической верификацией первичных данных. Представленные заключения логично вытекают из содержания работы и имеют убедительную доказательную базу.

Обоснованность результатов дополнительно обеспечивается многоуровневым характером их экспериментальной проверки. Антигенные свойства полученных рекомбинантных белков исследованы с использованием сывороток нескольких видов лабораторных животных, в том числе на моделях экспериментальной инфекции и вакцинации, после чего диагностические характеристики выбранных антигенов протестированы на клиническом материале. Существенное значение имеет включение в исследование сывороток, содержащих антитела к широкому спектру родственных ортофлавириусов, что позволило оценить специфичность разработанного метода в условиях потенциальной серологической перекрестной реактивности. Достоверность полученных результатов повышается также за счет сопоставления данных разработанной методики ИФА с результатами исследования образцов с использованием коммерческих диагностических наборов и реакции нейтрализации. Использование нескольких взаимодополняющих подходов к оценке исследуемых образцов снижает вероятность методозависимой интерпретации результатов и усиливает доказательность основных положений, сформулированных в диссертации.

Оценка содержания, завершенность работы и качество ее оформления

Диссертационная работа изложена на 137 страницах, иллюстрирована 18 таблицами и 43 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, раздела с рекомендациями и перспективами дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и одного приложения. Библиографический список включает 295 источников.

Результаты и научные положения диссертации соответствуют пунктам 7 и 10 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Несомненным достоинством работы является качество изложенного материала, представленного последовательно и аргументировано. Диссертация написана грамотным языком с соблюдением требований научного стиля. Во введении раскрыта актуальность темы исследования, определены цель и задачи диссертационной работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, показаны степень достоверности результатов и их апробация. В главе «Обзор литературы» представлен глубокий анализ данных из современных источников, посвященных биологии и эпидемиологии ортофлавивирусов, клиническим проявлениям КЭ, особенностям постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа при КЭ и основным подходам к диагностике КЭ. Структура обзора литературы соответствует логике последующей экспериментальной работы: от общих сведений о биологии и эпидемиологии ВКЭ автор переходит к рассмотрению структуры и антигенных свойств белка Е, особенностей формирования гуморального иммунного ответа и существующих подходов к серологической диагностике инфекции. Особое внимание уделено проблеме перекрестной реактивности антител к различным представителям рода *Orthoflavivirus*, непосредственно связанной с основной научной задачей диссертационного исследования. Анализ приведенных литературных данных позволяет автору обосновать выбор отдельных структурных элементов белка Е в качестве рекомбинантных антигенов и необходимость их сравнительного исследования.

В разделе «Материалы и методы» подробно перечислены и описаны биологический материал и широкий спектр современных молекулярно-биологических и иммунохимических методов, что свидетельствует о высоком научно-методическом уровне работы.

В главе «Результаты и обсуждение» материал изложен последовательно в соответствии с поставленными задачами. Каждый раздел главы сопровождается поясняющей вводной частью, таблицами и рисунками, что повышает информативность диссертационной работы. Изложены результаты экспериментальной работы по получению и валидации рекомбинантных антигенов ВКЭ. На основе биоинформатического анализа сконструированы генетические конструкции, кодирующие домены гликопротеина Е ВКЭ - sE, dI+II, dIII (штамм Сухар) и sE (штамм Софьин). Проведена многоэтапная оптимизация условий экспрессии, включающая подбор среды, параметров индукции, режимов солиubilизации, концентрации имидазола при аффинной хроматографии и условий рефолдинга. Первичный анализ подтвердил иммунореактивность всех полученных белков по отношению к антителам против ВКЭ. Для разработанной ИФА-методики установлены пороговые значения; в ходе скрининга мышинных, кроличьих и

обезьяньих сывороток, включая модели экспериментальной инфекции и вакцинации, оценена чувствительность к различным штаммам ВКЭ и перекрестные реакции с вирусом Повассан. Исследование клинического материала от людей подтвердило диагностическую применимость системы. Отдельно изучена специфичность взаимодействия антигенов с антителами к широкому спектру ортофлавивирусов (ВЗН, желтой лихорадки, Денге, Зика, Лангат и др.), включая оценку влияния вакцинации против желтой лихорадки на результаты серодиагностики ВКЭ. В завершение проведено сравнительное исследование разработанной методики с коммерческими ИФА-тест-системами, продемонстрировавшее ее диагностические преимущества в условиях перекрестного иммунитета. Включение в анализ образцов с антителами к близкородственным ортофлавивирусам позволило проверить исследуемые антигены в условиях, моделирующих одну из наиболее сложных ситуаций реальной серологической диагностики. Отдельно следует положительно оценить исследование образцов до и после вакцинации против желтой лихорадки, поскольку такой эксперимент позволяет оценить влияние дополнительного ортофлавивирусного иммунного ответа на результаты выявления антител к ВКЭ.

В конце диссертации представлено заключение, содержащее основные выводы по теме исследования, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Выводы и рекомендации обоснованы и соответствуют полученным данным и поставленным задачам. По материалам диссертационной работы опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах данных – Web of Science, Scopus, RSCI, PubMed, соответствующих требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертационного исследования. Материалы исследования были представлены на российских и международных конференциях. Содержание публикаций отражает материалы диссертационной работы. Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

Таким образом, содержание диссертации полностью соответствует заявленной теме и поставленной цели. Работа объединяет молекулярно-биологический, биохимический, вирусологический и иммунологический этапы в единый экспериментальный цикл, завершенный оценкой диагностического потенциала полученных рекомбинантных антигенов. Последовательность проведенных исследований, использование разнообразного биологического материала и сопоставление результатов различными методами позволяют рассматривать сформулированные автором положения как результат комплексного и методически обоснованного исследования.

Замечания

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Однако при прочтении диссертации выявлены отдельные неудачные формулировки, неточности, опечатки и терминологические ошибки.

На странице 7 использован разговорный оборот: «Наличие IgM антител может указывать на свежую инфекцию».

На стр. 64 допущена опечатка в предложении: «Лигирование проводили, смешивая вектор и вставку в эквимоллярном соотношении 1:3 и 1:9 соответственно, в течение 16 часов при 14°C».

У рисунков 19 (А) и (Б) некорректные названия, указывающие что это «Гель-электрофорез с полученными клонами со вставкой...», тогда как на рисунке представлены ПЦР-продукты.

В таблице 11 не уточнен класс антител, выявляемых в ИФА, хотя это важно для верной интерпретации результата.

На стр. 74 и 96 приводятся значения 3,1 и 7,8 мг, при этом из контекста неясно – это концентрация белка в препарате, или выход белка с 1 литра культуры?

У рисунка 36 отсутствует название.

К диссертанту также имеются уточняющие **вопросы**

1. В Обзоре литературы отмечено, что домены I и II белка Е ВКЭ «...имеют в своём составе кросс-реактивные эпитопы, что свидетельствует о возможности их использования в качестве основы для пан-флавивирусной тест-системы [210]». Как это согласуется с достигнутой в диссертации высокой специфичностью иммуноферментной тест-системы на основе sЕ, включающего домены I, II и III белка Е ВКЭ?

2. На стр. 87 указано, что при использовании рекомбинантного белка sЕ, при тестировании человеческих сывороток, эффективность выявления анти-ВКЭ антител составила 98%, белка dIII - 66%, белка dI+II - 42%. Почему этот показатель нельзя было назвать «диагностической чувствительностью»?

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Совокупность представленных результатов позволяет высоко оценить вклад В.С. Барышниковой в разработку подходов к дифференциальной серодиагностике клещевого энцефалита. Полученные данные имеют значение как для понимания антигенных свойств отдельных структурных доменов белка Е ВКЭ, так и для дальнейшего совершенствования рекомбинантной антигенной основы для ИФА.

Диссертация Барышниковой Виктории Сергеевны на тему: «Дифференциальная серодиагностика клещевого энцефалита на основе рекомбинантных доменов белка Е» является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. Диссертационная работа по своей актуальности, научной новизне, теоретической и

практической значимости, объему и уровню проведенных исследований, достоверности полученных результатов соответствует требованиям установленным в пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным 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 диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Барышникова Виктория Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

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

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией прикладной вирусологии
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова,
доктор биологических наук (1.5.10. Вирусология)
e-mail: faizuloev@mail.ru
тел. +7 (495) 917-49-00



Евгений Бахтиерович Файзулов

Подпись д.б.н. Файзулова Е.Б. заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова



А.В. Васильева

«31» августа 2026 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Адрес: 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, дом 5А. Тел.: 8-495-917-49-00, E-mail: mech.inst@mail.ru.