

ОТЗЫВ

официального оппонента,
кандидата биологических наук Шаршова Кирилла Александровича на диссертацию
Ушкаленко Никиты Дмитриевича «Разработка быстрого иммунохимического теста для
выявления ортопоксвирусов», представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология.

Актуальность и степень разработанности темы диссертационной работы

Натуральная оспа, вызываемая вирусом натуральной оспы (*Variola virus*)- одна из наиболее известных особоопасных инфекций, поражающей исключительно человека. При этом все остальные виды ортопоксвирусов (ОПВ), имеют природные резервуары среди различных видов животных и, поэтому, классифицируются как зоонозные патогены.

Автором проанализирована основная доступная информация о современных представителях ОПВ, актуальности их изучения и контроля. Очевидно, что в системе мероприятий по борьбе с зоонозными ортопоксвирусами большое значение имеет ранняя идентификация возбудителя, определяющая эффективность противоэпидемических мер. Диагноз не может быть поставлен только по клиническим признакам из-за полиморфизма симптоматики, характерной для многих экзантемных заболеваний, что требует обязательного лабораторного подтверждения. Например, вирус оспы коров считается родоначальником других ортопоксвирусов и обладает широким спектром природных хозяев, что способствует его устойчивому циркулированию в животных популяциях и потенциальной передаче человеку. Таким образом, ортопоксвирусы имеют значительный зоонозный потенциал, представляя риск передачи инфекций от животных к человеку с возможными серьезными последствиями для здоровья и эпидемиологии.

В диссертации был проведен поиск и анализ всех известных на данный момент способов и средств диагностики (ПЦР, ИФА, электронная микроскопия и пр.). На первом этапе работы сделан обоснованный вывод, что методы индикации ОПВ требуют усовершенствования, как в плане повышения чувствительности и оперативности получения результатов, так и в отношении простоты выполнения анализа, позволяющей использовать тест непосредственно в очаге заражения, у постели больного или в ограниченных условиях лаборатории с высоким уровнем защиты.

Анализ степени разработанности темы, качественно проведенный автором, показал, что диагностика спорадических случаев заболеваний, ассоциированных с ОПВ, сопряжена со значительными трудностями, поскольку их клинические проявления часто схожи с симптомами других инфекционных патологий. В то же время, своевременная идентификация возбудителя становится критически важной для реализации этиотропной

терапии и карантинных ограничений. Оперативность этих мероприятий напрямую определяет успешность локализации очага инфекции. Дифференциация возбудителя инфекции может быть произведена по биологическим свойствам вируса, по характерной морфологии вирусных частиц, по уникальным свойствам генетического материала, а также по специфическим свойствам вирусных белков, выделенных из патологического материала. Методы изучения биологических свойств возбудителя позволяют идентифицировать конкретные поксвирусы, однако они трудоемки, требуют много времени (поскольку включают выделение и размножение вируса) и ограничены хорошо оборудованными лабораториями с высоким уровнем биологической защиты. Подробный анализ выявил существующие преимущества и недостатки современных методов, существующие в настоящее время варианты иммунохимического анализа ОПВ вследствие недостаточной чувствительности или сложности исполнения мало подходят для реализации в африканских сельских районах со слабо развитой лабораторной базой или в условиях ограничений лабораторий с высоким уровнем биологической защиты.

Актуальность проблемы опасности ортопоксвирусов для человека определила предмет и цель исследования, а именно работы по разработке чувствительного, быстрого и простого в применении иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов и оценка его эксплуатационных характеристик.

В целом, актуальность молекулярно-биологических и вирусологических прикладных исследований по разработке и оптимизации диагностики ОПВ сомнений не вызывает.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость исследования

Автором впервые отработана оригинальная технология изготовления и применения автономного диагностического набора «РОХ-экспресс» для ускоренного выявления ОПВ методом одностадийного дот-иммуноанализа. Проведены лабораторные испытания набора с использованием широкого круга ОПВ, в том числе высоко патогенных для человека вирусов 10 натуральной оспы и оспы обезьян, и доступных клинических образцов от инфицированных лабораторных животных и человека.

Автор впервые показал, что подобная модификация диагностики может эффективно применяться в отношении ряда ортопоксвирусов. Показано, что применение набора с визуальным учетом результатов анализа позволяет в течение 35 мин при температуре от 20 до 40°C выявлять ОПВ в неочищенных вирусных препаратах, биологических и клинических материалах в концентрации, превышающей 104 БОЕ/мл. Разработанный набор может быть полезен при обнаружении вирусной угрозы в различных приложениях биологической

защиты.

Установлено, что простота применения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании, энергоресурсах и высокой квалификации оператора позволяет использовать разработку при выполнении анализов непосредственно в очаге заражения, у постели больного или в ограниченных условиях лаборатории с уровнем биобезопасности BSL 3 или BSL 4. Подготовлены проекты научно-технической документации на производство и применение набора «РОХ-экспресс»: лабораторный регламент, ТУ, инструкция по применению.

Полученные автором данные имеют важное прикладное значение и перспективы внедрения в практическое здравоохранение. Особенно это касается регионов, эндемичных по ортопоксвирусным инфекциям. Подобная работа крайне важна для также для дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики таких инфекций.

Теоретическая значимость же работы заключается в расширении имеющихся на сегодняшний день фундаментальных знаний о культивировании и патогенезе, ряд публикаций посвящен этому аспекту.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, объединенной главы «Результаты и обсуждение» (пять разделов), заключения, выводов и списка литературы. Главы обсуждение не присутствует, обсуждение представлено в каждом соответствующем разделе. Работа изложена на 120 страницах, включает 24 рисунка, 18 таблиц и 4 приложения. Библиографический указатель содержит 205 источников, в том числе 24 – работы отечественных и 181 – зарубежных авторов.

Автором подробно обоснована актуальность темы исследования, определены цель, задачи диссертационной работы, методология исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описана апробация результатов исследования и личный вклад автора.

Глава «Обзор литературы» написана грамотным языком и соответствует тематике данной работы: Обзор литературы включает 10 разделов, в которых представлены современные сведения о таксономии, морфологии, репликации, геноме и белках, устойчивости к факторам внешней среды ОПВ. Освещены вопросы патогенеза и клинических проявлений, лечения и профилактики, а также лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых ОПВ. В конце этой главы не имеется заключение.

Глава «Материалы и методы» полно представляет использованные методики и свидетельствует о большом объеме проделанной автором работы. Глава содержит описание использованных в работе материалов (вирусов, биологических и клинических

образцов, антител, контрольных препаратов, реактивов и рабочих растворов); вирусологических (культивирование и титрование вирусов *in vitro*, инфицирование лабораторных животных и получение клинических образцов); морфологических (электронная микроскопия с негативным контрастированием), иммуно-химических (доп анализ в разных модификациях) и информационных (компьютерная обработка изображения матриц и статистическая обработка результатов) методов. При испытаниях набора использовали образцы вирусов из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Глава «Результаты и обсуждение» имеет 5 основных структурированных раздела, в которых представлены результаты исследований. В части, касающейся обсуждения результатов, в данной главе соискатель приводит глубоко осмысленный и подробный анализ полученных результатов исследования.

В разделах «Заключение» и «Выводы» представлены все полученные автором результаты. Выводы диссертации четко сформулированы, обоснованы, закономерно вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

В целом, диссертация соответствует паспорту специальности «Вирусология» (пункты 7, 10), по которой она представлена к защите, написана ясно и логично, а ее оформление отвечает существующим требованиям. В автореферате отражены основные результаты диссертационной работы.

Достоверность результатов, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах. Достоверность поддерживается также большим объёмом экспериментальных данных с использованием широкого круга ОПВ (в том числе высоко патогенных для человека ВНО и ВОО) с использованием методов, адекватных целям и задачам исследования, а также методов статистической обработки полученных результатов.

Научные положения, выводы и заключение, сформулированные в диссертации, обоснованы объёмом проведённых исследований, методическими подходами, использованием современных методов исследования. Основные положения, выносимые на защиту, и выводы логично вытекают из полученных результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов не вызывают сомнений.

Публикации и апробация результатов, личный вклад.

Результаты работы отражены в 11 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых: 1 монография, 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 6 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором или при его участии. Часть работ, таких как культивирование непатогенных и слабопатогенных для человека ортопоксвирусов, работа с инфицированными кроликами, подготовка и титрование образцов проводилась совместно с сотрудниками других профильных подразделений ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Данные об этом, а также благодарности, отражены в автореферате и диссертации.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Работа однозначно оценивается положительно. Некоторые замечания в оформлении не являются критическими для этого хорошего исследования. Присутствуют некоторые опечатки и несогласованные предложения в тексте диссертации (например, на стр. 8, 51, 58). Ниже некоторые комментарии, на которые хотелось бы получить ответы и мнение автора в контексте самой сути исследования.

1. Работа без всяких сомнений прикладная, в связи с чем возникает вопрос: чем обусловлен выбор специальности «вирусология», а не «биотехнология»? Работа может соответствовать этим двум специальностям, а именно по специальности «Вирусология» пунктам паспорта 7 и 10; по специальности «Биотехнология» пунктам паспорта 2, 9, 24.
2. Вопрос к формулировке задач: задача номер два некорректно сформулирована или является подзадачей в данной работе? («Разработанный тест должен обладать чувствительностью выявления ортопоксвирусов в образцах при концентрации не более 105 БОЕ/мл и специфичностью на уровне рода»).
3. Раздел 3.1.1. главы Результаты описывает ранее описанные методы со ссылкой на источники, что целесообразно было поместить в раздел Методы. Также очевидно, что некоторые другие методы описаны в соответствующем разделе результатов, например проведение экспериментов с животными. Объем главы материалы и методы таким образом составил 6 страниц. С чем связано такое расположение, схема написания?
4. В собственных результатах приведены снимки вирусных препаратов, сделанные с

помощью электронного микроскопа. Однако, в подписях нет параметров съемки. Раздела методов работы на электронном микроскопе тоже нет. Какие параметры использовали при работе с электронным микроскопом?

В целом, работа оценивается положительно, вопросы и комментарии не являются принципиальными, нисколько не умоляют ценности и качества работы.

Заключение

Диссертационная работа Ушкаленко Никиты Дмитриевича «Разработка быстрого иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основе выполненных автором исследований разработан диагностический набор для быстрого выявления ортопоксвирусов на основе одностадийного дот-иммуноанализа на белковых матрицах.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор, Ушкаленко Никита Дмитриевич, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент: руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов НИИ вирусологии
ФГБУ «Федеральный исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной
медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии,
e-mail: sharshov@yandex.ru
Тел. +7 960-794-21-36
к.б.н. Кирилл Александрович Шаршов



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,
г. Новосибирск, 630117, ул. Тимакова, д. 2
телефон/факс приемной: +7(383)333-64-56.

Личную подпись Шаршова К.А. заверяю
Зед. специалист отдела кадров ФИЦ ФТМ
"01" 09 2025 г. подпись Е.А.В.Венидиктова

