

## Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу  
Батурина Артема Александровича "Дифференциация генотипов вируса Западного  
Нила, циркулирующего на территории европейской части России", представленной на  
соискание учёной степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.10 – вирусология

### Актуальность темы исследования

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – природно-очаговая арбовирусная инфекция с трансмиссивным механизмом передач в основном через укусы комаров. Возбудителем инфекции является вирус Западного Нила (ВЗН), который принадлежит семейству Flaviviridae, роду Orthoflavivirus, виду Orthoflavivirus nilense. ВЗН широко распространен в тропических и умеренного климатических территориях Африки, американского континента, Европы, Азии и Австралии. В России за период 1997-2010 гг. заболевания населения лихорадкой Западного Нила регистрировались в Астраханской, Волгоградской, Ростовской, Ульяновской, Воронежской, Челябинской областях, Краснодарском крае и Республике Калмыкия. Несколько новых случаев ЛЗН выявлено в РФ и в 2023 году. Для сравнения: за весь 2022 год выявили 33 случая, большая часть из них — в Центральном федеральном округе, а не на юге, где, впрочем, болезнь тоже встречается, как и на Урале и даже в Сибири. Средний показатель за последние годы составляет 117 случаев. Обнаружен ВЗН и на территории с более суровым климатом, в частности, в Финляндии выявили комаров — носителей этого вируса. Помимо этого, ареал ВЗН охватывает Молдавию, Украину, Белоруссию, Армению, Азербайджан, Грузию, Казахстан, Таджикистан, Киргизию, Узбекистан, Туркменистан.

Резервуаром инфекции служат преимущественно дикие и домашние птицы водного или околородного экологического комплекса. Основными переносчиками ВЗН являются комары рода Culex, в значительно меньшей степени - иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи.

Клинические проявления ЛЗН разнообразны и варьируют от бессимптомного течения до развития тяжелых форм менингита и менингоэнцефалита. ЛЗН может протекать в виде гриппоподобной формы с головными болями, повышением температуры тела, першением в горле. Прогрессирование заболевания приводит к осложненному течению, проявляющемуся в виде менингитов и менингоэнцефалитов. До настоящего времени не зарегистрированы случаи передачи ВЗН от человека к человеку.

Геномы различных штаммов ВЗН характеризуются значительной генетической вариабельностью. По современным данным изоляты ВЗН можно разделить на 9 генотипов. Дифференциация ВЗН на генотипы основана на сравнительном анализе полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома. Установлено, что наибольшей вирулентностью обладают изоляты ВЗН генотипа 7. В России зарегистрирована циркуляция ВЗН генотипов 1, 2 и 4.

Этиологическая лабораторная диагностика ЛЗН включает, во-первых, обнаружение специфических АТ IgM и IgG к АГ вируса; во-вторых, детекцию РНК вируса в крови, ликворе, моче; в-третьих, изоляцию вируса. Выявление специфических АТ обладает наибольшей диагностической чувствительностью. АТ IgM появляются на 3–4-й день болезни, АТ-IgG – на 7–10-й. Для подтверждения диагноза обязательным является исследование образцов крови, взятых с интервалом 7–10 дней, исследование проводят

преимущественно методом ИФА. Обнаружение РНК вируса с использованием ПЦР может дополнять выявление специфических АТ, особенно на территориях, эндемичных по другим флавивирусным инфекциям (клещевому энцефалиту, денге, японскому энцефалиту и др.). Диагностическая чувствительность ПЦР-исследований не превышает 50% (на первой и третьей неделе заболевания она составляет около 25%, на второй неделе – около 40–50%), что обусловлено низкой концентрацией вируса в биологических жидкостях.

Подтвердить наличие в организме вируса лихорадки западного Нила можно только по анализу крови и спинномозговой жидкости. В случае диагностики тяжелой формы вирусной инфекции, сопровождающейся менингитом или энцефалитом, обязательно выполнение спинальной пункции и анализ состава спинномозговой жидкости.

На сегодняшний день предложено множество способов генотипирования возбудителя ЛЗН, большинство из которых основано на секвенировании генома ВЗН или его участков. Для определения полногеномной нуклеотидной последовательности штаммов ВЗН 1, 2 и 4 генотипов методом секвенирования по Сенгеру разработаны специфичные праймеры. Однако способ генотипирования, основанный на секвенировании, является трудоёмким и может быть реализован только для образцов с высокой концентрацией вирусной РНК. Большинство клинических образцов имеет низкое содержание вируса, что существенно снижает эффективность применения секвенирования для определения генотипа ВЗН в нативном материале.

К моменту начала диссертационной работы соискателя в России были разработаны три различных набора реагентов для обнаружения РНК ВЗН в биологическом материале методами ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Эти наборы обладают высокой чувствительностью и специфичностью выявления генетического материала ВЗН, но не позволяют дифференцировать генотипы ВЗН. В России не было разработано диагностических наборов для обнаружения и дифференциации генотипов ВЗН методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов.

В этой связи работа Батурина Артема Александровича, посвящённая конструированию набора реагентов для дифференциации генотипов ВЗН методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекции и изучению особенностей циркуляции и распространённости генотипов ВЗН в различных регионах европейской части России, является, несомненно, актуальной для здравоохранения России.

#### **Научная новизна диссертационного исследования.**

Соискателем на основе сравнительного анализа геномов ВЗН, депонированных в международной генетической базе данных GenBank NCBI, впервые сконструированы 3 пары олигонуклеотидных праймеров и 3 флуоресцентно-меченых зонда, комплементарные фрагменту гена полипротеина, кодирующего капсидный белок ВЗЛ, и предназначенные для дифференциальной детекции трёх генотипов вируса Западного Нила - 1, 2 и 4 генотипов. На праймеры и зонды получены патенты РФ.

Получены и запатентованы 3 штамма бактерий *E. coli* JM 109, несущих сконструированные рекомбинантные плазмиды, содержащие ДНК-вставки

комплементарные нуклеотидным последовательностям 5'-нетранслируемой области и участку гена полипротеина вируса Западного Нила 1, 2 и 4 генотипов соответственно. Рекомбинантные плазмиды могут быть использованы в качестве положительных контролей при проведении генотипирования ВЗН в исследуемых биологических образцах.

На основе сконструированных олигонуклеотидов и рекомбинантных плазмид соискателем разработан оригинальный «Набор реагентов для дифференциального выявления трёх генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила методами ОТ\_ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции».

С применением разработанного набора соискателем получены новые данные об особенностях циркуляции и распространенности генотипов ВЗН в различных регионах европейской части России. В частности, им установлено, что в России в 2010 – 2022 гг. циркулировал ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, причём преимущественное распространение в большинстве субъектов европейской части России, входивших в исследование, имел ВЗН генотипа 2.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В процессе выполнения диссертационного исследования соискателем был разработан методический подход для генотипирования вируса Западного Нила на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентного учета результатов, который позволит повысить эффективность эпидемиологического мониторинга за возбудителем ЛЗН.

Наиболее важное практическое значение имеют исследования соискателя, направленные на создание набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» для выявления и дифференциации генотипов 1, 2, 4 вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией в образцах клинического и аутопсийного материала от человека, а также зооэнтомологического материала.

Определены генотипы ВЗН, циркулирующего на территории европейской части России в период с 2010 по 2022 гг. с помощью методов ОТ-ПЦР в реальном времени и секвенирования.

Получены три штамма *E. coli* JM109, несущие рекомбинантные плазмиды, содержащие ДНК-вставки комплементарные соответствующим нуклеотидным последовательностям 5'-нетранслируемой области и участку гена полипротеина вируса Западного Нила 1, 2 и 4 генотипов, соответственно. Рекомбинантные плазмиды используются в созданном диагностическом наборе в качестве положительного контроля при проведении полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекции геномной РНК ВЗН в исследуемых образцах.

Проведённые соискателем контрольные лабораторные, технические и клинические испытания разработанного набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» показали его высокую аналитическую чувствительность, специфичность и пригодность для дифференциального обнаружения трёх генотипов РЗН (1, 2 и 4), циркулирующих на территории России. Набор прошёл все этапы государственной экспертизы в Росздравнадзоре и на него получено регистрационное удостоверение РЗН 2022/17020 от 27.04.2022 г. и разрешение на производство, реализацию и применение в качестве

медицинского изделия в лабораторной практике.

Полученные соискателем результаты и разработанный методический подход могут быть использованы в эпидемиологических исследованиях, а также для создания аналогичных систем диагностики инфекции, вызываемой другими генотипами ВЗН.

### **Степень достоверности результатов исследования**

Достоверность результатов работы определяется использованием современных молекулярно-биологических методов исследования (выделение геномных РНК ВЗН, ОТ-ПЦР, гибридизационно-флуоресцентная детекция геномной РНК ВЗН в анализируемых образцах, секвенирование ДНК по Сэнгеру, генно-инженерные методы конструирования и клонирования ДНК), а также метода филогенетического анализа. Апробация набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» проведена на репрезентативной выборке 411 положительных проб, поступивших в Референс-центр по мониторингу за возбудителем ЛЗН из 14 регионов европейской части России в период 2010 – 2022 гг. Результаты ПЦР-типирования, полученные с использованием разработанного набора, были подтверждены методом секвенирования образцов РНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов по участку генома ВЗН размером 277 п.н., соответствующему 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) и локусу гена полипротеина, кодирующему капсидный белок (protC).

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на фактических данных, представленных в материале диссертации. Достоверность результатов, полученных в работе, подтверждена постановкой экспериментов в нескольких повторах. Результаты экспериментальных исследований обработаны с использованием методов статистического анализа. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании. Материалы диссертации вошли в отчеты по проведенным контрольным лабораторным, техническим и клиническим испытаниям набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4».

Всё выше изложенное свидетельствует о высоком профессиональном и методическом уровне исследования. Большой объем экспериментального материала и использование современных информативных методов анализа при конструировании диагностического набора и исследовании особенностей территориального распределения генотипов ВЗН, циркулирующих в России, а также теоретическое обобщение полученных данных позволили автору сформулировать основные научные положения и выводы диссертационной работы, высокая степень достоверности которых несомненна.

Диссертационная работа Батурина А.А. оформлена в соответствии с Национальным стандартом РФ (ГОСТ Р 7.0.11-2011), изложена на 119 листах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, перечня сокращений и списка литературы, включающего 217 источников, в том числе 30 отечественных и 187 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 15 таблицами.

Содержание диссертации характеризуется четким, последовательным изложением. Текст работы написан понятным литературным языком. Выводы логически вытекают из полученных данных. Результаты исследования достаточно полно апробированы, докладывались на 7-ти всероссийских научных форумах, проходивших с 2013 по 2023 г.г.

Основное содержание работы отражено в 22 научных публикациях, из них 8 статей в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, и 6 патентов на изобретения. Материалы диссертации вошли в отчеты по проведенным контрольным лабораторным, техническим и клиническим испытаниям набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4».

Все это позволяет высоко оценить диссертационное исследование Батурина А.А. Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет.

### **Заключение**

Кандидатская диссертация Батурина Артема Александровича "Дифференциация генотипов вируса Западного Нила, циркулирующего на территории европейской части России", выполненная под научным руководством кандидата медицинских наук, доцента Ткаченко Галины Александровны, является законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований изложены новые данные о генетическом разнообразии, особенностях территориального распределения генотипов вируса Западного Нила, циркулирующих в России. Диссертационная работа вносит значительный вклад в развитие эпидемиологии вируса Западного Нила и в создание высокоспецифичных методов детекции и дифференциации этого вируса.

Диссертационное исследование по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842) с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а её автор, без сомнения, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

### **Официальный оппонент:**

Главный научный сотрудник, руководитель  
лаборатории генной инженерии  
НИИ биологии ФГБНУ ФИЦ ФТМ  
доктор биологических наук, профессор

А.Б. Беклемишев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Россия, 630117 г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2)  
эл. почта: ab.beklem-46@yandex.ru

Личную подпись А.Б. Беклемишева заверяю  
В.В. Спирин отдела кадров ФИЦ ФТМ  
"21" 11 2023 г. подпись А.Б. Беклемишева

