

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Роспотребнадзора,
академик РАН, д.м.н., профессор
В.Г.Акимкин



2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической значимости диссертационной работы Батурина Артема Александровича «Дифференциация генотипов вируса Западного Нила, циркулирующего на территории Европейской части России», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

Актуальность темы выполненной работы. Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – природно-очаговая арбовирусная инфекция, широко распространенная в районах с тропическим и умеренным климатом. История изучения данного заболевания включает, как примеры значительной активации его передачи в ранее описанных природных очагах, в том числе с существенным расширением их границ, так и уникальные эпизоды распространения ареала возбудителя на новые континенты. Несмотря на большое количество исследований, посвященных эпидемиологии ЛЗН, многие аспекты, связанные с активацией природных очагов заболевания, остаются недостаточно изученными. При этом естественная эволюция возбудителя, безусловно является ключевым компонентом, влияющим на активность эпидемического процесса. Наблюдаются существенные различия

в географической распространенности девяти генетических линий возбудителя, при этом в Российской Федерации наблюдается циркуляция 1, 2 и 4 генотипов. Максимальной информативностью для генетической характеристики вируса ЛЗН, безусловно имеют методы секвенирования информативных участков генома, прежде всего гена капсида. Однако значительная часть клинических и биологических образцов характеризуется низкой концентрацией возбудителя, что затрудняет наработку продуктов для проведения таргетного секвенирования. Единственной возможностью проведения генотипической характеристики данных образцов является использование генотипоспецифической ОТ-ПЦР, применение которой позволяет обеспечить более высокую аналитическую чувствительность исследования.

Таким образом, приведенные данные указывают на актуальность темы диссертационной работы, направленной на разработку лабораторной методики для дифференциации генотипов ВЗН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Оценка научной новизны и практической значимости.

Научная новизна исследования, проведенного диссертантом, заключается в разработке набора реагентов для идентификации 1, 2 и 4 генотипов вируса Западного Нила, включающей разработку оригинального дизайна олигонуклеотидов, генноинженерных конструкций в качестве контрольных образцов и определении распространенности указанных генотипов в различных регионах европейской части России. Автором было установлено доминирование 2 генотипа на большинстве территорий, включенных в исследование.

Значимость результатов исследования для науки и практики.

Разработан методический подход для генотипирования вируса Западного Нила на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, который позволит повысить эффективность эпидемиологического мониторинга за возбудителем ЛЗН.

Разработка нашла практическую реализацию в виде набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4», получившего регистрационное удостоверение на территории РФ. Результаты работы внедрены в практику научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора.

Достоверность результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечивается обоснованным выбором и применением современных методов и средств проведения исследований, грамотным планированием экспериментальной работы и достаточными для выполнения поставленных задач объемами материала.

Внедрение результатов исследования.

Внедрение набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» в практику работы Референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора позволило повысить оперативность проведения скринингового эпидемиологического мониторинга распространенности превалирующих генотипов ВЗН на территории Российской Федерации.

Материалы диссертации используются в программах обучения в рамках дополнительного профессионального образования по программам профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертации.

Текст диссертации изложен на 119 страницах машинописного текста, построен по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, пяти глав, содержащих описание основных разделов исследования, заключения, выводов, благодарностей и списка литературы. Список литературы включает 217 источника: 30 отечественных и 187 иностранных. Работа содержит 8 иллюстраций и 15 таблиц.

Во введении диссертации представлено аргументированное обоснование актуальности темы работы, современное состояние проблемы, цель и задачи исследования. Изложены научная новизна и теоретическая и практическая значимость проведенной работы, положения, выносимые на защиту, раскрыты научная и практическая значимость полученных результатов, приведены сведения о внедрении результатов исследования в практику, опубликованных работах и структуре диссертации.

В первой главе диссертации представлена характеристика возбудителя лихорадки Западного Нила, дана характеристика молекулярно-генетических методов диагностики ЛЗН и современные данные о генетической гетерогенности популяций возбудителя и методах ее оценки.

Во второй главе диссертации **«Материалы и методы»** подробно охарактеризованы объекты исследования, включавшие штаммы ВЗН, пробы клинического, энтомологического и зоологического материала. Автором детально описаны основные этапы проведения молекулярно-генетических исследований, а также использование программ и баз данных и статистических методов анализа результатов (пакет программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США)).

Третья глава диссертации содержит подробное описание основных этапов разработки набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Автором подробно освещаются вопросы выбора мишеней в геноме возбудителя, разработки дизайна олигонуклеотидов, создание генноинженерных контрольных образцов и подбор условий проведения амплификации специфических продуктов.

Четвертая глава диссертации посвящена валидации аналитических характеристик разработанной методики. Ее аналитическая чувствительность составила 1×10^4 ГЭ/мл. Оценку диагностических характеристик набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» осуществляли в рамках клинических испытаний, 108 образцах клинического материала от пациентов,

инфицированных West Nile virus; 36 модельных образцах клинического материала; 99 образцах биологического материала от животных, комаров и клещей, инфицированных West Nile virus и 33 модельных образца биологического материала от животных и клещей. В ходе клинических испытаний было установлено, что диагностическая чувствительность набора реагентов при исследовании проб, содержащих РНК и кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, составила 98,5% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность набора реагентов при исследовании проб, содержащих гетерологичные вирусы и бактерии, составила 99% с доверительной вероятностью 90%.

В **пятой** главе представлены результаты апробации разработанного набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» на 411 архивных образцах клинического и зооэнтомологического материала из Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Липецкой, Пензенской, Ростовской и Саратовской областей, Краснодарского и Ставропольского краев, Республик Татарстан, Дагестан и Крым, собранных в период с 2010 по 2022 год. Методом секвенирования подтверждены результаты ПЦР-типирования и изучены особенности распространенности генотипов ВЗН в различных регионах европейской части России за исследуемый период.

Представленная на рассмотрение работа является прикладным научным исследованием, в ходе которого был разработан и применен на практике методический подход для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции. Применение данного подхода позволило изучить особенности циркуляции и распространенности генотипов вируса Западного Нила в различных регионах европейской части России. Разработанный подход может быть рекомендован для усовершенствования схемы лабораторной диагностики ЛЗН и дифференцировки генотипов возбудителя при проведении эпидемиологического мониторинга на территориях, где возможна циркуляция возбудителя ЛЗН.

Принципиальных **замечаний** к работе нет. В качестве пожеланий по дальнейшему прикладному применению результатов работы, автору можно порекомендовать проработку единого алгоритма использования методов генотипирования ВЗН с применением разработанного набора реагентов и таргетного секвенирования информативных для филогенетического анализа участков генома возбудителя.

Таким образом, поставленные задачи решены в полном объеме, цель работы достигнута. Замечаний по целевой установке, методологическому построению работы, достоверности полученных результатов нет.

По теме исследования опубликовано 22 научные работы, из них 8 статей в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, и 6 патентов на изобретения.

Автореферат в полной мере отражает данные диссертационного исследования и соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

Личное участие автора представлено на всех этапах работы – от планирования дизайна исследования до реализации поставленных задач по разработке, валидации набора реагентов, проведении его технических и клинических испытаний и практического применения для изучения особенностей циркуляции генотипов возбудителя лихорадки Западного Нила на территории европейской части России.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы Батурина А.А. могут успешно дополнить применяемые схемы мониторинга за циркулирующими в России штаммами ВЗН, позволяя повысить оперативность его проведения и эффективность генотипирования в образцах с низкой концентрацией патогенов.

Материалы диссертации используются в учебном процессе в рамках дополнительного профессионального образования по программам профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности.

Диссертация Батурина А.А. «Дифференциация генотипов вируса Западного Нила, циркулирующего на территории Европейской части России» полностью соответствует паспорту специальности 1.5.10. Вирусология.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Батурина А.А. «Дифференциация генотипов вируса Западного Нила, циркулирующего на территории Европейской части России», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научная проблема, достигнута поставленная цель и решены задачи по разработке и успешному практическому применению методического подхода для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила, которая имеет важное значение для совершенствования эпидемиологического мониторинга за возбудителем ЛЗН.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов и выводов диссертационная работа Батурина Артема Александровича соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

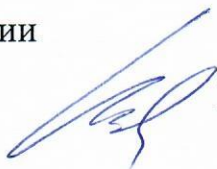
Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции от 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук.

Отзыв на диссертационную работу Батурина А.А. был заслушан, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора от 26.10.23 г., протокол № 9.

Заместитель директора по эпидемиологии

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии

доктор медицинских наук



Подколзин Александр Тихонович

Подпись д.м.н. Подколзина А.Т. заверяю:

Ученый секретарь

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии

Роспотребнадзора, канд. мед. наук



Никитина Т.С.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а. Тел. 8-495-672-10-69, e-mail: cri@psr.ru