

ОТЗЫВ

официального оппонента Кюрегяна Карена Кареновича на диссертацию Холодилова Ивана Сергеевича «Переносимые клещами флави- и флавиподобные вирусы, циркулирующие на территории России», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по научной специальности 1.5.10. – Вирусология.

Актуальность темы диссертационного исследования.

Представители рода *Flavivirus* способны вызывать тяжелые заболевания человека с поражением центральной нервной системы и геморрагическими лихорадками. Одним из наиболее значимых для здравоохранения Российской Федерации флавивирусов является вирус клещевого энцефалита. Поскольку флавивирусы являются арбовирусами, их экология и эволюция во многом определяется экологией переносчиков соответствующих вирусов. В последние годы наблюдается расширение на север ареалов обитания многих членистоногих, как насекомых, так и клещей, являющихся переносчиками флавивирусов. Это наблюдение справедливо и для иксодовых клещей, являющихся основными переносчиками вируса клещевого энцефалита - *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*. Расширение их ареала приводит и к расширению ареала вируса клещевого энцефалита. Наиболее значимые процессы эволюции арбовирусов, в том числе вируса клещевого энцефалита, можно ожидать на границах ареала и в зонах совместного обитания клещей разных родов и видов, где высока вероятность возникновения новых вариантов вируса в связи со сменой переносчиков и основных прокормителей. Однако количество работ по выявлению и генетической характеристике вируса клещевого энцефалита на новых для него территориях ограничено.

Другим, не менее важным вопросом, является выделение из иксодовых клещей на территории циркуляции вируса клещевого энцефалита малоизученных флави- и флавиподобных вирусов, патогенность которых для человека еще не уточнена. Следует отметить, что исследований по выявлению, изоляции и изучению биологических свойств флавиподобных вирусов на территории Российской Федерации до настоящего времени не проводилось.

В связи с вышеизложенным, тема диссертационной работы Холодилова И.С. «Переносимые клещами флави- и флавиподобные вирусы, циркулирующие на территории России» представляется актуальной.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Полученные в результате работы результаты, сформулированные выводы и выносимые на защите положения полностью соответствуют цели и задачам исследования. Диссертационное исследование выполнено на современном методическом уровне, достоверность полученных результатов

не вызывают сомнения. Цели и задачи диссертационного исследования изложены четко и по своей значимости соответствуют уровню исследований, необходимому для представления кандидатской диссертации и соответствуют паспорту специальности 1.5.10. - Вирусология. Результаты диссертационной работы опубликованы в шести высокорейтинговых зарубежных журналах и в одном российском журнале из списка ВАК, доложены на зарубежных и российских конгрессах.

Достоверность и новизна результатов диссертации.

Достоверность полученных автором результатов определяется большим объемом и разнообразием исследованных материалов (7 тыс. клещей, относящихся к 12 видам), значительным временным интервалом полевого сбора образцов (2014-2018 гг.) и широкой географией исследования (республики Карелия, Татарстан, Тыва, Ставропольский край, Калининградская, Челябинская и Ульяновская области). Достоверность результатов экспериментов определяется использованием в работе стандартных методик, контролей и строгим соблюдением условий проведения опытов.

Для решения задач исследования автором привлечен и адекватно использован широкий спектр вирусологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов. Полученные данные интерпретированы корректно и подвергнуты адекватной статистической обработке. Основные научные положения диссертационной работы прошли экспертизу при публикации в виде научных статей в рецензируемых журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, а также при представлении в виде докладов на международных и отечественных научных конференциях.

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что автором показано существование на территории Российской Федерации сочетанных очагов клещевого энцефалита и инфекций, вызываемых переносимыми клещами флавиподобными вирусами Алонгшан и Янггоу. Установлена широкая распространенность вируса Алонгшан и показано разделение вируса на филогенетические группы, не только определяемые географическим происхождением изолятов, но и соответствующие основному клещу-переносчику - *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Показана способность вирусов Алонгшан и Янггоу длительно персистировать в культуре клеток клещей *Hyalomma anatolicum* и *Ixodes ricinus*, не вызывая цитопатического эффекта. Репродукция вирусов Алонгшан и Янггоу в клеточных линиях разных видов клещей может указывать на то, что, во-первых, эти вирусы могут быстро адаптироваться к разным видам клещей, и, во-вторых, что их переносчиками потенциально могут служить различные виды клещей. Также значительным вкладом автора являются новые данные о морфологии вирионов вируса Алонгшан.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов.

Автором получены новые данные об особенностях распространения и эволюции вируса клещевого энцефалита на границах его ареала в различных климатических зонах и разных биотопах. Установлено, что одним из наиболее важных факторов, определяющих генетическое разнообразие вариантов вируса клещевого энцефалита, циркулирующего на границах ареала, является занос вирусов/клещей из других регионов, при этом локальные очаги инфекции могут значительно различаться по значимости этого фактора. Автором впервые выявлена на территории Российской Федерации циркуляция флавиподобных вирусов Алонгшан и Янггоу, обладающих потенциальной патогенностью для человека, и изучены биологические свойства этих вирусов: установлена морфология вирионов, дана генетическая характеристика, определена способность к репродукции и хронической инфекции в клетках членистоногих. Данное исследование является отправной точкой для исследования новых переносимых клещами флавиподобных арбовирусов.

Важным представляется вклад результатов диссертационной работы в практический вопрос надзора за вирусом клещевого энцефалита. Полученные автором результаты продемонстрировали преимущество метода ПЦР перед ИФА при выявлении вируса клещевого энцефалита в клещах. Автором установлены и подтверждены экспериментально причины ложноположительных реакций в ИФА, связанные с перекрестными реакциями с переносимых клещами флавивирусами млекопитающих и с обитающими в клещах микроорганизмами. Представленные автором данные о циркуляции потенциально опасных для человека флавиподобных вирусов и о существовании сочетанных очагов клещевого энцефалита и флавиподобных вирусных инфекций имеют практическую ценность, поскольку могут служить основой для коррекции профилактических и противоэпидемических мероприятий, и важны при оценке эффективности существующих и создании новых профилактических и лечебных препаратов.

Значительным практическим выходом работы также является депонирование в GenBank 21 последовательности генома вируса клещевого энцефалита, 38 – вируса Алонгшан и 1 – вируса Янггоу.

Структура работы

Диссертация построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Перспективы дальнейшей разработки темы», «Список сокращений» и «Список литературы». Работа изложена на 143 страницах текста и содержит 28 рисунков и 27 таблиц. Библиографический указатель содержит 249 источников.

Во введении описаны актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, проблемы, на решение которых направлена

работа, и сформулированы основные цели и задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из двух основных разделов. В первом автор дает подробную характеристику вирусов рода *Flavivirus*, во втором – характеристику флавиподобных вирусов.

В разделе «Материалы и методы» автор достаточно полно описывает все использованные в ходе выполнения работы экспериментальные процедуры. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием как классических вирусологических, так и самых современных подходов, включая высокопроизводительное секвенирование и биоинформатические методы анализа нуклеиновых последовательностей.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из трех глав и содержит описание полученных результатов и их анализ. В целом, проведенное исследование логично продумано и аккуратно выполнено. Первая глава раздела посвящена сравнению методов ИФА и ПЦР для выявления вируса клещевого энцефалита в биологических материалах и анализу причин неспецифических реакций в ИФА при выявлении вируса клещевого энцефалита в клещах. Вторая глава раздела посвящена выявлению и изоляции флави- и флавиподобных вирусов на границах ареала вируса клещевого энцефалита в России – в республиках Карелия, Татарстан, Тыва, в Ставропольском крае, в Калининградской, Челябинской и Ульяновской областях. Третья глава раздела посвящена характеристике выявленных флавиподобных вирусов Алонгшан и Янггоу. Каждая глава завершается обсуждением полученных результатов, выстроенным логично и нацеленным на обоснование сделанных автором выводов.

Автореферат диссертационной работы оформлен в соответствии с требованиями ВАК и полностью отражает содержание диссертации. Публикации по теме диссертации полностью соответствуют ее содержанию и содержат основные результаты работы.

Замечания и вопросы по содержанию работы.

Работа содержит небольшое количество опечаток и несогласованных предложений, что, однако, не критично для восприятия работы. Положительно оценивая диссертационную работу Холодилова И.С., необходимо, тем не менее, отметить ряд недостатков:

1. Обзор литературы излишне краток – с учетом темы работы имело бы смысл дать краткое описание методических подходов к выявлению флавивирусов и, в частности, вируса клещевого энцефалита, в клещах; привести краткое описание эпидемиологии клещевого энцефалита; описать тенденции в изменении ареала переносчиков.
2. В разделе Материалы и методы не описано, как проводилась сборка полных геномов вирусов Алонгшан и Янггоу из прочтений высокопроизводительного секвенирования.

3. Фраза «С помощью ИФА и ПЦР нам удалось выявить бактерии рода *Pseudomonas spp.* при анализе клещей из природы» (стр. 48) не имеет смысла, поскольку речь идет о неспецифической реакции в ИФА, а не о выявлении бактерий, кроме того, специфичность детекции РНК вируса клещевого энцефалита в ПЦР не оценивалась на панели образцов бактерий.
4. На карте, отображающей эндемичные по клещевому энцефалиту территории России (Рис. 12), имело бы смысл выделить регионы исследования, как это сделано на карте в автореферате.
5. В таблицах с указанием видового и численного состава клещей, собранных в регионах исследования, вместо пустых ячеек следовало указать, что в данной точке указанный вид клещей собран не был.
6. В обсуждении автором не отмечено ограничение данного исследования – спектр выявленных вариантов флавиподобных вирусы ограничивается степенью универсальности использованных в работе праймеров «панфлави» и специфических праймеров к сегменту 2 вируса Алонгшан. Вероятно, при анализе вириона клещей методом высокопроизводительного секвенирования число геновариантов флавиподобных вирусов было бы больше, хотя и использованный автором подход правомерен и оказался результативным. Также при ознакомлении с диссертационной работой возникли несколько вопросов для уточнения:
1. Хотелось бы узнать мнение диссертанта, чем обусловлен выбор метода ближайших соседей (neighbor joining) вместо метода максимального правдоподобия (maximum likelihood) при проведении филогенетического анализа последовательностей вируса Алонгшан. При этом для филогенетического анализа последовательностей вируса клещевого энцефалита автор использовал метода максимального правдоподобия.
 2. Хотелось бы прояснить, в чем целеполагание оценки чувствительности детекции антигена вируса клещевого энцефалита в ИФА при нарушении протокола производителя использовавшейся тест-системы? Предполагается, что нарушение протокола производителя любого лабораторного теста приводит к невалидным результатам, не подлежащим интерпретации.
- Указанные замечания и вопросы не снижают общей положительной оценки данной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Холодилова Ивана Сергеевича на тему: «Переносимые клещами флави- и флавиподобные вирусы, циркулирующие на территории России» представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации

№335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016, №650 от 29.05.2017, №1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.01.2018, №426 от 20.03.2021), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.10. – Вирусология.

Официальный оппонент:

Заведующий отделом изучения социально-значимых вирусных инфекций
Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной
медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного
профессионального образования» Минздрава России
доктор биологических наук (1.5.10. – Вирусология), профессор РАН
тел.: 8 (495) 680-05-99,
e-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru



Кюрегян Карен Каренович

Подпись Кюрегяна К.К. удостоверяю.

Ученый секретарь

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного
профессионального образования» Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор

« 24 »



Чеботарёва Татьяна Александровна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования «Российская медицинская
академия непрерывного профессионального образования» Министерства
здравоохранения Российской Федерации.

Адрес: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Тел.: +7 (800) 505-22-12, +7 (495) 680-05-99 доб.900; факс: +7 (499) 254-98-05

E-mail: rmapo@rmapo.ru, <https://rmapo.ru>