

## ОТЗЫВ

официального оппонента Ларичева Виктора Филипповича на диссертацию Холодилова Ивана Сергеевича на тему: «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 диссертационной работы.

Вирусы сем. Flaviviridae и рода Flavivirus – представители экологической группы арбовирусов, передающихся восприимчивым позвоночным через укусы кровососущих членистоногих: комаров, клещей, moskitov, мошек и мокрецов.

Такие флививирусные инфекции, как лихорадка денге, геморрагическая лихорадка денге, жёлтая лихорадка, энцефалиты – японский, клещевой, Сент-Луис, долины Муррея, Западного Нила и другие представляют огромное значение для здравоохранения в эндемичных регионах мира.

Борьба, а часто и этиологическая расшифровка вспышек арбовирусных инфекций затрудняются огромным антигенным разнообразием возбудителей, массивностью эпидемических вспышек с охватом в короткий срок значительных групп населения.

Флавивирусы вызывают тяжелые заболевания у человека с поражением центральной нервной системы и геморрагическими лихорадками. Показана их способность быстро распространяться на огромные территории, изменять вирулентность и использовать альтернативные пути передачи.

В связи с глобальным потеплением изменяется ареал переносчиков, что позволяет вирусам появляться на территориях, где их никогда не детектировали и не регистрировали связанную с ними заболеваемость.

Ожидается, что наиболее значимые процессы эволюции арбовирусов происходят 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.

Как показали исследования, ареал вируса клещевого энцефалита (КЭ) в последнее время существенно расширяется вслед за расширением ареала переносчиков. Так клещи *I. persulcatus* были найдены около Полярного круга, а клещи *I. ricinus* – за Полярным кругом.

В тоже время на распространение флавивирусов могут оказывать влияние и другие вирусы или микроорганизмы, циркулирующие в клещах. На-

пример, в Китае были выделены флавиподобные вирусы, которые отличаются от классических flavivirusов принципиально другим строением генома и представляют обособленную группу в семействе Flaviviridae. Имеются данные о возможной патогенности этих вирусов для человека.

В свете изложенных проблем актуальность темы диссертационной работы Холодилова Ивана Сергеевича, посвященной поиску и характеристике переносимых клещами флави- и флавиподобных вирусов не вызывает сомнения.

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

Представленная на отзыв работа выполнена на хорошем организационно-методическом уровне. Дизайн исследования в целом и основные методологические подходы следует признать современными и адекватными поставленным задачам. Сформулированные автором выводы базируются на результатах в основном собственных исследований, подвергнутых рациональной математической обработке, и отражают достижение цели диссертационной работы. Не вызывает принципиальных возражений и формулировка новизны исследования, теоретической и практической значимости работы. Научная интерпретация полученных данных проведена в свете современных парадигм вирусологии. Основные научные положения диссертации подверглись экспертизе при опубликовании статей в рецензируемых научных изданиях и были предметом обсуждения на научно-практических конференциях.

Достоверность и новизна научных положений и выводов.

Достоверность полученных результатов, научных положений и выводов, представленных в диссертации И.С. Холодилова, определяется тщательно проведенным анализом разработанности темы, большим объемом материалов исследования, использованием сертифицированного оборудования, апробированных, надежных методов исследований, обеспечивших современный научно-методический уровень.

В работе представлен целый ряд положений и результатов, обладающих несомненной новизной. Основным является научное положение о том, что основными факторами эволюции вируса являются вид основного переносчика и наиболее важным фактором, определяющим разнообразие вариантов ВКЭ, циркулирующих на границах ареала, является занос вирусов/клещей из других регионов.

Показано широкое распространение сегментированных флавиподобных вирусов (вирус Алонгшан и вирус Янггоу) на территории РФ. Получена первичная вирусологическая и молекулярно-генетическая характеристика флавиподобных вирусов Алонгшан и Янггоу. Получены полные нуклеотидные последовательности 4 геномов вируса Алонгшан и 1 генома вируса Янггоу.

Инновационный, тщательно проработанный методический подход, представленный в диссертации, позволил реализовать все поставленные задачи.

#### Оценка практической значимости работы.

Практическая значимость диссертационной работы более чем очевидна. Автором получены данные о большей эффективности детекции вируса КЭ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) по сравнению с ИФА. Также показано, что ареал распространения вируса КЭ расширяется, и это сигнализирует о необходимости коррекции или пересмотра профилактических и противоэпидемических мероприятий в регионах РФ.

#### Содержание диссертационной работы.

Диссертация написана по классическому типу, изложена на 143 страницах и состоит из введения и 3-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, а также заключение, выводы, список литературы, содержащий 249 источников. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 28 рисунками.

В обзоре литературы в 11-ти разделах отражены практически все данные о флавивирусах. Содержание обзора литературы определяется направленностью диссертационных исследований, полностью отвечает своему назначению, а также хорошо коррелирует с целями и задачами диссертационной работы. В обзоре проведен детальный анализ 249 литературных источников, что свидетельствует о профессиональной эрудиции автора.

В качестве улучшения Литобзора, по моему мнению, можно было бы уделить больше внимания роли флавивирусов в заболеваемости. Особенно бросается в глаза подраздел «1.1.4.4 Вирус Западного Нила» «...вирус Западного Нила был выделен и была отмечена заболеваемость в Краснодарском крае, Ростовской, Астраханской и Волгоградской областях,..». «Была отмечена»

на заболеваемость» - это про крупные эпидемические вспышки с летальностью около 10%? Так же можно было бы подчеркнуть, что впервые вирус ЗН на территории СССР был выделен как раз из клещей в 1963 г. и именно сотрудниками Института полиомиелита.

Так как часть диссертационной работы посвящена сравнению эффективности при детекции вируса КЭ в образцах, то можно было бы в Литобзор добавить подраздел, показывающий, как обстоят дела с выявлением других вирусов.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит подробные сведения о материалах и методах исследований, способах статистической обработки данных, свидетельствующие о многосторонней квалификации автора и высоком методическом уровне выполненной работы. В процессе проведения исследований были использованы методы культивирования клеток, концентрации и очистки вируса, иммуноферментный анализ. Значительная часть работы выполнена с применением молекулярно-биологических методов, включающих филогенетический анализ.

Хочу отметить, что в разделе отсутствует описание метода бляшкообразования, хотя в работе метод используется многократно!

Сразу хочу задать вопрос, касающийся данного раздела. Действительно ли содержание животных и их эвтаназия проводится в соответствии с Заключением Этического Комитета? Мне казалось, что все процедуры подчиняются Межгосударственному стандарту «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Или это стилистическая ошибка?

В подразделе 3.1. представлены данные о сравнительном изучении эффективности и чувствительности ИФА («ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест»)), ПЦР-РВ – набора реагентов серии «МультиПрайм» для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, переносимыми иксодовыми клещами (ИнтерЛабСервис, «АмплиСенс») и ПЦР с использованием праймеров на фрагмент генома, кодирующего белок NS5 флавивирусов (панфлави). Показано, что ПЦР-РВ является более специфичным методом. ПЦР с использованием панфлави праймеров выявляла все используемые флавивирусы в концентрации меньшей, чем ИФА.

Странным выглядит определение, данное в диссертации, специфичности метода: «Под специфичностью метода понимают долю истинно отрицательных результатов среди всех проведенных тестов». Тем более, что далее

по тексту или по результатам нельзя увидеть, как используется это определение.

При оценке специфичности различных методов выявления ВКЭ с использованием представителей рода *Flavivirus* в диссертации не представлен ход экспериментов, есть только результирующая таблица, где специфичность выражена в IgБОЕ/мл. Не понятно, в какой момент титровались образцы, допускает ли производитель набора ИФА титрование образцов. Что такое «максимальная концентрация...», в чем эта концентрация (культуральная жидкость или мозговая суспензия), почему максимальная концентрация указана не для всех образцов?

В подразделе 3.1.3 дается оценка возможных неспецифических реакций в ИФА с микроорганизмами, обитающими в клещах. Установлено, что одной из причин ложноположительных реакций при проведении ИФА может являться неспецифическое взаимодействие с микроорганизмами, обитающими в клещах.

В Обсуждении раздела 3.1 подводится итог части работы по изучению специфичности и чувствительности методов детекции вируса КЭ. Автор пишет: «В данной работе мы выявили некоторые возможные причины появления ложноположительных реакций в ИФА: перекрестные реакции с флавивирусами млекопитающих, переносимых клещами; перекрестные реакции с микроорганизмами, обитающими в клещах». Не соглашусь, что ложноположительное срабатывание набора с пробой с микроорганизмами (не флавивирусами) является результатом перекрестной реакции. На перекрестном взаимодействии основывалась значительная часть классификации вирусов (да и не только вирусов) в до молекулярную эпоху. Суть перекрестного взаимодействия заключается в наличии схожих антигенных детерминант у близкородственных вирусов. Наличие у бактерии антигенов, похожих на антигены вируса КЭ, необходимо доказывать.

Раздел 3.2 «Выявление и изоляция флави- и флавиподобных вирусов на границах ареала вируса клещевого энцефалита в России» - ядро диссертации. Описанная масштабная работа вызывает уважение и восхищение. В период с 2008 года по 2019 год в различных регионах Российской Федерации было проанализировано на наличие флавивирусов 7122 клещей 12-ти видов. Большая часть клещей были собраны на южной границе распространения ВКЭ. В республике Тыва было проведено с 2008 по 2017 года 6 экспедиций с целью изучения видового состава клещей и наличия в них возбудителей флавиви-

русских инфекций. Сбор клещей проводили с начала мая до середины июня на флаг с растительности в лесных массивах высокогорья, среднегорья и низкогогорья, в долинах и поймах рек, в степных и лесостепных зонах, в местах отдыха населения, а также с домашних животных: коров, овец, собак, лошадей.

В ходе работы показано, что сегментированные флавиподобные вирусы (Алонгшан и Янггоу) широко распространены на территории РФ от Калининградской области на западе до республики Тыва на востоке. В то же время на территории России существуют сочетанные очаги ВКЭ и флавиподобных вирусов, циркулирующих в клещах.

Впечатляющий раздел «Общая характеристика выявленных флавиподобных вирусов» содержит информацию о вирусологической и молекулярно-генетической характеристике новых флавиподобных вирусов. Штаммы вирусов Алонгшан и Янггоу успешно размножаются в культуре клеток IRE/CTVM19, формируя персистентную инфекцию. Впервые показано, что штамм Miass527 вируса Алонгшан может сохраняться в клетках клещей не менее трех лет. Кроме того, выявлена способность штаммов вирусов Алонгшан и Янггоу вызывать длительную персистентную инфекцию в культуре клеток HAE/CTVM8.

Проведенный филогенетический анализ с использованием фрагментов генома сегментов 1 и 2, так и полных аминокислотных последовательностей белка VP1a (сегмент 2), позволяет разделить штаммы вируса Алонгшан на две группы: «*I. persulcatus*» и «*I. ricinus*».

Раздел «Заключение» и подразделы «Обсуждение» в целом построены логично и убедительно.

Выводы отражают четко сформулированные решения поставленных задач. Однако есть пара замечаний, касающихся вывода № 1. Словосочетание «могут быть» – не для выводов! Также, в этом выводе указывается на перекрестные реакции между вирусом КЭ и другими (не флавивирусами) микроорганизмами. Что, с одной стороны, ставит знак равенства между ложноположительной реакцией и перекрестной реакцией или, с другой стороны, указывает на наличие у этих микроорганизмов антигенных детерминант, похожих на антигены вируса КЭ.

Работа написана грамотным научным и литературным языком, содержит очень малое количество грамматических и стилистических ошибок.

Теоретическая и практическая ценность представленной на отзыв диссертации не вызывает сомнений.

Материалы диссертации достаточно полно изложены в статьях в отечественных и зарубежных журналах. Результаты работы были представлены на 10 международных и отечественных конференциях.

Автореферат отражает содержание диссертации, содержит все формальные сведения о диссертации и отражает ее содержание.

Рецензируемая работа производит положительное впечатление: исследования актуальны, новы, представляют несомненную научно-практическую ценность.

Оценивая положительно представленную диссертацию, было бы целесообразно в процессе официальной защиты выяснить у автора перспективы использования данных о низкой эффективности иммуноферментного анализа для детекции вируса КЭ в переносчиках.

#### Заключение.

Диссертационная работа Холодилова Ивана Сергеевича: «Переносимые клещами флави- и флавиподобные вирусы, циркулирующие на территории России» является самостоятельным научным трудом на актуальную тему, направленным на изучение процессов эволюции флавивирусов и их роли в патологии человека. Научно обоснованы и реализованы все этапы исследований. В работе решены научные фундаментальные и прикладные задачи. Достоверность данных обеспечивается представительностью выборки образцов, достаточным числом проведенных исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к оценке результатов, выполненным с использованием современных методов.

Таким образом, 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 пп. 9 – 14 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:

Ведущий научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, доктор медицинских наук  
тел.: 8 (499) 193-30-01,  
e-mail: vlaritchev@mail.ru

Ларичев Виктор Филиппович

Подпись Ларичева В.Ф. удостоверяю.

Ученый секретарь

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ

кандидат биологических наук



Кожевникова Людмила Кондратьевна

«21» февр. 2022 г.

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.