

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ФБУН ГНЦ
ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
доктор биологических наук

В.А. Максютов

«25» *сентября* 2022 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека на диссертационную работу

Холодилова Ивана Сергеевича

**«Переносимые клещами флави- и флавиподобные вирусы,
циркулирующие на территории России»**, представленную на соискание
учёной степени кандидата медицинских наук
по специальности 1.5.10 – «Вирусология»

Актуальность темы диссертационного исследования

Актуальность диссертационной работы связана с тем, что она направлена на исследование молекулярной эпидемиологии клещевых инфекций. В число клещевых инфекций входят многие возбудители инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной и паразитарной природы. На территории России в их число наиболее часто включают клещевой энцефалит (КЭ), энцефалит Повассан, Омскую геморрагическую лихорадку, клещевой боррелиоз, клещевой риккетсиоз, бабезиоз, эрлихиоз, бартонеллез и лихорадку Западного Нила.

Важнейшими клещевыми инфекциями человека в России, передающимися через укус клеща, является клещевой энцефалит, боррелиоз, эрлихоз и риккетсиозы. Ежегодно регистрируется до полумиллиона случаев обращения человека за медицинской помощью по

поводу укуса клеща. Даже при условии оказания медицинской помощи, ежегодно регистрируется до 7-8 тысяч заболеваний клещевым энцефалитом и боррелиозом. Общий список клещевых инфекций вирусной, риккетсиозной, бактериальной и паразитарной природы насчитывает несколько десятков возбудителей инфекционных заболеваний, ассоциированных с иксодовыми клещами, и он постоянно расширяется в связи с открытием инфекционных агентов. Важно отметить, что иксодовые клещи являются кровососущими паразитами млекопитающих, птиц и рептилий, что обеспечивает передачу возбудителей клещевых инфекций в различных природных очагах между разными видами организмов. Проблема усложняется тем, что род *Ixodes* состоит из более чем 249 видов клещей и является самым представительным родом в семействе *Ixodidae* (713 видов клещей). Он входит в субпорядок *Ixodida*, состоящий из 899 видов клещей.

При этом семейство флавивирусов (*Flaviviridae*), во многом ассоциированное с иксодовыми клещами, также включает в себя большое количество разнообразных вирусов. Данное семейство состоит из четырех родов: собственно, флавивирусы (*Flavivirus*), пестивирусы (*Pestivirus*), пегивирусы (*Pegivirus*) и гепацивирусы (*Hepacivirus*). В составе семейства описано 89 различных видов вирусов и более 50 новых неклассифицированных флавивирусов. Самый многочисленный род флавивирусов включает в себя 53 вида вирусов, объединяющих 75 различных флавивирусов. Флавивирусы являются важнейшими патогенами для человека, причем более половины из них способны вызывать тяжелые заболевания. Важно отметить, что диссертационная работа рассматривает вопросы, связанные с молекулярной эпидемиологией новых, недавно открытых многокомпонентных флавиподобных вирусов. Фактически можно констатировать пионерский характер диссертационной работы в части обнаружения в РФ и изучения вирусов Алонгшан и Янггоу.

Вне сомнения, вопросы молекулярной эпидемиологии и таксономии возбудителей клещевых инфекций, взаимосвязанные с биологическим разнообразием клещей переносчиков, исследованы на настоящее время недостаточно полно. Проведенное исследование генетических маркеров клещевых инфекций, в том числе и новых многокомпонентных вирусов, позволило уточнить их ареал распространения, получить информацию о генетическом разнообразии исследованных возбудителей клещевых

инфекций. Важно отметить, что знание особенностей генетической разнообразия возбудителей клещевых инфекций имеет принципиальное значение для дальнейшего развития и совершенствования методов профилактики, лечения и диагностики этих инфекций. Фактически проведенные исследования могут позволить установить контроль над клещевыми инфекциями, в том числе и новыми, в природных очагах на территории нашей страны.

В процессе выполнения диссертационной работы автором была сформулирована основная цель исследования: поиск и характеристика переносимых клещами флави- и флавиподобных вирусов, циркулирующих на границе ареала вируса клещевого энцефалита на территории Российской Федерации.

Для достижения цели исследования решались следующие основные задачи:

- Проведение оценки, специфичности и чувствительности методов выявления ВКЭ при исследовании биологического материала;
- Формирование современной карты распространения ВКЭ;
- Исследование членистоногих, собранных на территории России на границе ареала ВКЭ, на наличие геномной РНК флави- и флавиподобных вирусов с использованием наборов специфичных праймеров для рода флавивирусов и его конкретных представителей;
- Изучение методами молекулярной эпидемиологии генетических особенностей популяций ВКЭ;
- Получение новой генетической информации и исследование вирусологических характеристик для флавивирусов и новых флавиподобных вирусов.

Цель работы и задачи исследования представляются актуальными. Положения, выносимые на защиту, полностью отражены в материалах диссертации. Основное содержание диссертационной работы позволяет говорить о решении поставленных автором задач. Полученные результаты не вызывают сомнений и являются принципиально новыми и научно обоснованными. Все выводы подтверждены экспериментальным материалом и являются логическим завершением диссертационной работы.

Научная новизна и важнейшие достижения исследования

Научная новизна работы заключается с том, что автору работы впервые удалось выявить и получить изоляты сегментированного флавиподобного вируса Алонгшан на территории России.

Впервые удалось выявить и изолировать штамм сегментированного флавиподобного вируса Янггоу из клещей, собранных на территории РФ.

Впервые было показано существование сочетанных очагов флави- и флавиподобных вирусов на территории России.

Показано, что популяция вируса Алонгшан помимо географической привязанности, филогенетически разделяется на группы, соответствующие основному клещу-переносчику *I. ricinus* и *I. persulcatus*.

Показана способность сегментированных флавиподобных вирусов Алонгшан и Янггоу длительно персистировать в культурах клеток клещей без развития цитопатического эффекта. Это позволило получить информацию о морфологии вирионов вируса Алонгшан.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Показано широкое распространение новых многокомпонентных флавиподобных вирусов (вирусы Алонгшан и Янггоу) на территории РФ от Калининградской области на западе до республики Тыва на востоке.
- Описаны особенности сочетанных природных очагов флавивирусов и флавиподобных вирусов в некоторых регионах РФ на основе анализа генетического материала вирусных агентов в иксодовых клещах собранных в различных географических районах.
- Проведена первичная вирусологическая и молекулярно-генетическая характеристика флавиподобных вирусов Алонгшан и Янггоу. Установлен факт длительной персистенции этих вирусных агентов в культурах клеток клещей *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM19) и *Hyalomma anatolicum* (HAE/CTVM8) и описана морфология вирионов вируса Алонгшан.
- Определены полные нуклеотидные последовательности 4 геномов вируса Алонгшан и 1 генома вируса Янггоу. Последовательности депонированы в международную базу данных GenBank и доступны для всех исследователей.
- Выполненный филогенетический анализа сегмента 2 вирусного генома позволил сформулировать гипотезу о том, что основные

факторы генетического разнообразия вируса Алонгшан взаимосвязаны с видами основного переносчика и местом изоляции вируса. Установлено, что изоляты вируса Алонгшан подразделяются в соответствии с основным видом переносчика на группы «*I. ricinus*» и «*I. persulcatus*». Причем группа «*I. persulcatus*» дополнительно разделяется на европейскую и азиатскую подгруппы.

Поставленные цели и задачи диссертационной работы полностью соответствуют полученным результатам.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 143 страницах, содержит 28 рисунков, 27 таблиц и два приложения. Список литературы содержит 249 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов.

В первой главе диссертационной работы представлен обзор литературы описывающий общую характеристику семейства флавивирусов и известные на настоящее время данные по многокомпонентным флавиподобным вирусам с особым вниманием к медицинскому значению новых многокомпонентных флавиподобных вирусов.

Во второй главе описаны методы и подходы, использованные для выполнения диссертационной работы. Описаны использованные биологические объекты, культуры клеток, вирусы, лабораторные животные, совокупность вирусологических, серологических и микробиологических методов. Отдельный раздел посвящен молекулярно-биологическим методам, включая методы определения нуклеотидных последовательностей и их анализа.

Третья глава посвящена описанию результатов и их обсуждению. Основные разделы данной главы связаны со сравнением методов выявления вируса клещевого энцефалита в биологических материалах, выявлением и изоляцией флави- и флавиподобных вирусов на границах ареала вируса клещевого энцефалита в России, проведением характеристики выявленных новых флавиподобных вирусов.

В заключение обсуждаются полученные результаты и выдвигаются гипотезы о возможной эволюции и широкой распространенности

многокомпонентных флавиподобных вирусов на территории нашей страны.

Отдельно хочется отметить, что работа замечательно иллюстрирована и автором проведена привязка мест сбора первичных материалов к географическим координатам. Это позволяет проводить долговременный мониторинг этих природных очагов в будущем.

Полученные результаты были апробированы на ряде российских и международных конференций и конгрессах. По теме диссертации опубликовано 7 научных статей, в том числе 6 статей в международных высокорейтинговых журналах индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Диссертационная работа соответствует опубликованным результатам.

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

Достоверность результатов диссертационного исследования Холодилова И.С. обоснованность основных положений, выводов и практических рекомендаций обеспечивается как современным уровнем исходных теоретических положений, так и разумной и адекватной задачам логикой плана исследования, использованием современных методов, соответствующих поставленной цели и задачам, корректной статистической обработкой и интерпретацией полученных результатов.

Необходимо отметить личный вклад соискателя. Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Таким образом, рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Холодилова Ивана Сергеевича является самостоятельным законченным исследованием, посвященным особенностям распространения и эволюции популяции ВКЭ, циркуляции флавиподобных вирусов Алонгшан и Янгтоу на территории РФ, их морфологии и генетическим особенностям новых многокомпонентных флавиподобных вирусов, а также создания модели для их культивирования в клетках клещей *Hyalomma anatolicum* (НАЕ/СТVM8) и *I. ricinus* (IRE/СТVM19). Полученные генетические данные могут стать основой для создания новых диагностических, профилактических и лечебных препаратов. С этой целью в GenBank были депонированы

нуклеотидные последовательности ВКЭ, вирусов Алонгшан и Янгоу. Принципиально важно подчеркнуть пионерский характер полученных данных по полногеномным последовательностям этих вирусов. Их теоретическую и научную значимость трудно переоценить, так как механизм реализации генетической информации многокомпонентных вирусов крайне плохо исследован и фактически не имеет аналогов в биосфере нашей планеты. Иногда, чтобы подчеркнуть его необычный характер применяют выражение «секс вчетвером» имея ввиду необходимость одновременного попадания четырех вирусных частиц в одну клетку для старта репликации вируса. Это также относится к крайне слабой изученности структурно-функциональных характеристик отдельных вирусных полипептидов. Полученная диссертантом новая генетическая информация может помочь закрыть пробелы в наших знаниях о структуре функциях геномов этих новых вирусов.

Высокая практическая значимость выполненной работы связана с развитием на этой базе генетической диагностики, а накопление информации о патогенности флавиподобных вирусов для домашних животных и человека делает крайне значимой необходимость развития методов диагностики, профилактики и возможно лечения этих вирусных инфекций. На мой взгляд, вся совокупность полученных результатов также обязательно станет основой для дальнейших эпидемиологических исследований этих инфекций и их санитарному надзору на территории РФ.

Общие замечания по диссертационной работе

Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- В раздел материалы и методы, подраздел 2.1.3. (стр. 28) было бы целесообразно уточнить полное название коллекции вирусных штаммов.
- Автором получен ряд новых вирусных изолятов с использованием перевиваемых клеток клещей. Было бы полезно формализовать описание новых вирусных штаммов, например, в виде паспортов вирусных штаммов с уточнением депонирования вирусных штаммов в коллекции вирусов (например, в приложении к данной работе). Это может оказаться полезным

для исследователей, работающих в этой и смежных областях в будущем.

- Ряд рисунков, особенно в разделе 1 содержит надписи двух языках (рисунки 1, 6, 7, 9, 10).
- Количество неточностей и опечаток в работе минимальное. В целом, должны признать, что в этом отношении работу можно признать образцовой.

Эти недостатки не снижают научной значимости диссертационной работы и, оценивая работу в целом, можно сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна, пионерский характер и достоверность не вызывают сомнений.

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-биологических методов исследования в сочетании с современными методами высокопроизводительного секвенирования и анализа полученных массивов последовательностей методами компьютерного анализа.

Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам.

Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы. Опубликованные научные труды, исчерпывающие отражают содержание диссертационной работы. Научные положения, выносимые на защиту, достаточно полно отражены в опубликованных работах.

Заключение

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Отзыв на диссертационную работу И.С. Холодилова «Переносимые клещами флави- и флавиподобные вирусы, циркулирующие на территории России» обсужден и принят на Научном семинаре отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Федерального Бюджетного учреждения науки

«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (Протокол № 47 от 25 февраля 2022 г.).

Соответствие диссертации требованиям ВАК

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. Диссертация 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».

Заведующим отделом
молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора,
д.б.н., проф.


В.Б. Локтев

Подпись Локтева В.Б. удостоверяю.
Начальник отдела кадров
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора


И.В. Ильин

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
Тел: +7(383)363-47-00

E-mail: vector@vector.nsc.ru

Сайт: <http://www.vector.nsc.ru/>

Локтев Валерий Борисович

630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора

Тел (383) 3367400 доп.2453

loktev@vector.nsc.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора.

Доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом
молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов.

СВЕДЕНИЯ

О составителе отзыва ведущей организации по диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук по специальности по
специальности 1.5.10 – «Вирусология».

Холодилова Ивана Сергеевича

«Переносимые клещами флави- и флавиподобные вирусы,
циркулирующие на территории России»,

ФИО составителя отзыва - Локтев Валерий Борисович

Ученая степень – доктор биологических наук

Ученое звание – профессор

Место работы: Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
Заведующим отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и
вирусных гепатитов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,

24 февраля 2022 г.

Локтев В.Б.

Подпись Локтева В.Б. удостоверяю:

Начальник отдела кадров

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



И.В. Ильин