

ОТЗЫВ

официального оппонента Локтева В.Б. на диссертационную работу Козловой Алины Александровны «Изучение ареала вируса Западного Нила в европейской части России», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.02 – вирусология.

Широкое распространение природно-очаговых вирусных инфекций в азиатской и европейской частях Российской Федерации существенно затрудняет работу общественного здравоохранения по снижению заболеваемости населения. Особое место среди вирусов, участвующих в формировании природных очагов вирусных инфекций, занимают флавивирuses. Известны примеры распространения комариных флавивирuses в течение последних десятилетий по обширным территориям Старого и Нового Света - это вирусы денге, Усуту, Кьясанурской лесной болезни и многие другие флавивирuses. Хорошо известно, что в различных регионах РФ также циркулируют вирусы клещевого энцефалита, Повассан, Западного Нила, Омской геморрагической лихорадки. Причем, количество серопозитивных лиц, например, к вирусу Западного Нила может достигать несколько десятков процентов в южных регионах РФ, а циркуляция вируса Западного Нила зарегистрирована во многих южных регионах РФ.

Особое место в скорости распространения по новым территориям занимает вирус Западного Нила (ВЗН). Проникнув в 1999 году на территорию атлантического побережья Северной Америки ВЗН в течение всего нескольких лет распространился по территории как Северной, так и Южной Америки. Аналогичная вспышка ЛЗН в Астрахани и Волгограде в 1999 году привела к распространению генотипа 1 ВЗН по Евразии вплоть до тихоокеанского побережья. В последние годы регистрируется дальнейшее распространение ВЗН по территории России, вплоть до границы начала лесотундры. Причем вторая волна распространения ВЗН по РФ связана уже и с генотипом 2 этого вируса. По всей вероятности, вариабельность генома флавивирuses обеспечивает достаточно быструю молекулярную эволюцию флавивирuses и их адаптацию к новым природно-географическим условиям. Способность флавивирuses реплицироваться в различных видах комаров (клещей), птиц и млекопитающих определяет их успешное внедрение в

различные типы природных очагов и быстроту распространения в новых природных ландшафтах.

Для ВЗН, передающегося комарами, и переносимого птицами на громадные расстояния, по всей вероятности, наиболее значимы эволюционные факторы, связанные с биологией птиц и их видовым разнообразием. Главными из них, видимо, являются высокая скорость смены мест обитания некоторыми видами птиц и персистенция (репликация) ВЗН в птицах в течение достаточно длительного времени. Видовое разнообразие комаров в местах обитания и гнездования птиц обеспечивает формирование природных очагов этой инфекции на новых территориях и в новых природных ландшафтах. Современные примеры глобального распространения генотипа 1a ВЗН, широкое распространение южно-африканского вируса Усуту в Центральной Европе, изменение географии генотипа III вируса денге и вируса Зика подтверждают гипотезу об ускоренной эволюции флавивирусов в современных природно-климатических условиях.

Пример глобального распространения вируса Зика показывает важность контроля завозных флавивирусных инфекций. Так первая крупная вспышка заболеваний лихорадкой Зика была зарегистрирована в 2007 году на острове Яп (Микронезия), где заболели около 5000 человек. Следующая крупная вспышка заболевания, в которой было зарегистрировано более чем 30 000 случаев лихорадки Зика, была описана во Французской Полинезии в 2013 году. Первые зарегистрированные случаи инфекции, связанные с вирусом Зика, в Южной Америке были выявлены в 2015 году, где ранее данное заболевание не регистрировалось. К 2017 году общее число стран, в которых зарегистрирована циркуляция вируса Зика, достигло 84. В Европе первый завезенный случай заболевания лихорадкой Зика был выявлен в Германии в 2013 году. В России, первый ранее описанный случай лихорадки Зика связан с туристом, который вернулся из Доминиканской Республики в Москву в начале 2016 года.

Аналогичная картина регистрируется и с вирусом денге, завозные случаи лихорадки денге регистрируются практически повсеместно на территории РФ. Генотипирование выделенных изолятов вируса денге показало, что завозные случаи лихорадки денге вызваны субтипами 1–4 вируса денге, с превалированием случаев инфекции вызванной вирусом денге 1. Секвенирование завозных изолятов вируса денге, в том числе и полногеномное, показало, что вирусные изоляты, выделенные на территории

России, филогенетически близки к современным вариантам вируса денге, циркулирующим в странах Юго-Восточной Азии.

Именно с этим связана актуальность и новизна диссертационной работы, направленная на мониторинг циркуляции ВЗН в эндемичных регионах страны и сопредельных территориях с целью определения современного ареала ВЗН с использованием серологических и вирусологических исследований. При флавивирусных инфекциях концентрация вирусной РНК в крови и ликворе может быть относительно небольшой и непродолжительной по времени. Поэтому вирусологические и иммунологические тесты, основанные на определении антител и выделение вирусных изолятов, обеспечивают повышение чувствительности и специфичности диагностики, особенно при острых случаях вирусных заболеваний, и дают новые возможности по мониторингу флавивирусных инфекций на территории России.

Диссертация Козловой А.А. написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав с описанием результатов собственных исследований материалов, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений.

Во введении определены актуальность проблемы, цели и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая ценность полученных результатов, а также положения, выносимые автором на защиту. Обзор написан подробно, ясно и логично. Раздел материалы и методы свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием классических методов современной вирусологии и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа. Результаты собственных исследований изложены в главах 3 - 6 разбитых на ряд подразделов. Результаты представлены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов.

Цель настоящей работы, в формулировке автора работы, состояла в «изучение ареала вируса ЛЗН на территории Европейской части РФ по данным серологических исследований. Решение методических вопросов, имеющих отношение к этой теме. Вирусологическая диагностика ЛЗН и других арбовирусных заболеваний».

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные задачи:

- Исследование сывороток крови населения, проживающего на территориях различных ландшафтно-климатических зон Европейской части России на IgG, IgM и нейтрализующие антитела к ВЗН.
- Серологическая диагностика случаев ЛЗН с применением ИФА-IgM, ИФА-IgG и РН для подтверждения достоверности и специфичности выявляемых антител к ВЗН.
- Оценка наличия вирусоспецифических IgM, IgG и нейтрализующих антител у больных ЛЗН и реконвалесцентов. Вирусологическое исследование больных острыми лихорадочными заболеваниями неясной этиологии.

Для выполнения задач диссертационной работы с применением методов ИФА-IgG, ИФА-IgM и РН были проведены широкие сероэпидемиологические исследования, направленные на изучение ареала ВЗН на территориях Европейской части России. Полученные результаты свидетельствовали об активности очагов ЛЗН в Южном, СевероКавказском, Приволжском, Центральном округах (лесостепная зона и Тульская область). Результаты исследования сывороток доноров из Калужской, Рязанской, Московской, Тверской, Вологодской и Ульяновской областей и Татарстана, оказались отрицательными. Это позволило высказать предположение, что современная северная граница ареала вируса Западного Нила находится на широте Тульской области. При этом исследование методами ИФА и РН сывороток крови 132 больных острыми сезонными лихорадочными заболеваниями позволило выявить 4 случая ЛЗН среди жителей Тульской области.

Было обнаружено отсутствие антивирусных IgM антител у реконвалесцентов через 243-358 дней после начала заболевания ЛЗН и сохранение IgG антител в 88,5% случаев и нейтрализующих антител в 91,7%. Эти данные подтвердили адекватность использования серологической диагностики ЛЗН, основанной на применении метода ИФА-IgM и целесообразность использования ИФА-IgG и РН для проведения сероэпидемиологических исследований.

В результате выполнения диссертационной работы были выделены и идентифицированы: один штамм ВЗН, шесть штаммов вируса ККГЛ, 17 штаммов вируса денге, два штамма вируса Зика и один штамм вируса Чикунгунья. Идентификация штаммов вирусов денге, выделенных от граждан РФ, возвратившихся в Москву из поездок в страны Юго-Восточной Азии, указывали на доминирующую циркуляцию вирусов денге 1 и денге 2. Все штаммы вируса ККГЛ были отнесены к генотипу Европа 1, а ВЗН был

отнесен к генотипу 1a циркулирующему в Астраханской области на протяжении пятидесяти с лишним лет.

Штаммы ВЗН, ККГЛ, Зика, Чикунгунья и денге перспективны для проведения филогенетических исследований и совершенствования диагностических тест-систем. Это позволило разработать набор реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, ЗН и Чикунгунья методом ИФА «ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чикунгунья». Регистрационное удостоверение на медицинское изделие РЗН 2018/7810 от 26 ноября 2018 года. Ряд штаммов был депонирован в Госколлекции вирусов и в Genbank.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Выявление активной циркуляции ВЗН в Южном федеральном округе (Краснодарский край и Астраханская область), Приволжском округе (Саратовская область) и Центральном округе ((лесостепная зона) и Тульская область (зона лиственных лесов). Подтверждение существования наиболее активных и стабильных очагов ЛЗН в Астраханской, Волгоградской, Ростовской областях и Краснодарском крае.
- Обнаружение случаев ЛЗН в Тульской области. Причем автор предполагает, что этот регион является современной северной границей ареала этой инфекции в Европейской части РФ.
- Установление перекрестных реактивности антител человека к вирусам клещевого энцефалита и ВЗН.
- Установления факта высокой диагностической значимости ИФА – IgM для диагностики ЛЗН в ранние сроки заболевания.
- Выделением одного штамма ВЗН, 6 штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа 1 (Астраханская область), 17 штаммов вирусов денге, 1 штамма вируса Чикунгунья, 2 штаммов вируса Зика от пациентов и депонированием их в Государственную коллекцию вирусов.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Козловой Алины Александровны является самостоятельным законченным исследованием, посвященным исследованию сывороток крови человека из различных географических регионов на наличие антивирусных антител, выделению и характеристике новых вирусных изолятов, разработке и характеристике набора реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья методом ИФА «ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чикунгунья».

Тем не менее, представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- На мой взгляд, включение ссылки на Международный таксономический комитет вирусов и его данных по таксономии флавивирусов (стр.20, табл. 1 диссертационной работы) позволило бы уточнить данную таблицу и дать более полное описание к ней (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus.)
- Распространение ВЗН в азиатской части России достаточно хорошо документировано. Было бы целесообразно включить эти данные в главу 1 диссертационной работы, что позволило более полно описать распространение ВЗН по всей территории РФ, включая Приморский край.
- К сожалению, не удалось найти упоминание и описание результатов, тесно связанных с темой диссертационной работы, и недавно опубликованных диссертантом (Infect Genet Evol. 2021, 7;88:104711. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104711). Представляется, что их включение в диссертационную работу существенно усилило бы данную работу и подчеркнуло ее научную значимость.
- В некоторых таблицах (табл. 3 автореферата и табл. 17 диссертации) не приведены данные статистической обработки результатов исследования. В случае данной таблицы они принципиально важны, т.к. идет сравнение перекрестной реактивности антител с антигенами ВЗН и ВКЭ.
- Количество неточностей и опечаток в работе минимальное. Некоторые редакционные замечания связаны с возможным улучшением диссертационной работы. Например, сокращение «нбм» нельзя признать удачным. В целом, должен признать, что количество неточностей в работе минимально и это ее выгодно отличает от многих других работ.

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

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор вирусологических и иммунологических методов для детекции антивирусных антител и выделения вирусных изолятов флавивирусов.

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

Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 139 страницах, содержит 26 таблиц. Список литературы содержит 172 ссылки на работы отечественных и зарубежных авторов.

Полученные результаты были апробированы на ряде российских совещаний, заседаний и конференций. По теме диссертации опубликовано 5 научных статей в рецензируемых журналах перечня ВАК.

Заключение

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научно-практические результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Автор исследовал сыворотки крови человека из различных географических регионов на наличие антивирусных антител, выделил и провел характеристику новых вирусных изолятов, разработал и изучил характеристики набора реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгунья методом ИФА «ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чикунгунья». Это позволило определить область применения тест-системы для выявления антивирусных антител в сыворотках крови больных арбовирусными инфекциями и изучить особенности их использования для диагностики этих вирусных инфекций.

Представляется, что диссертационная работа закладывает новые возможности для развития понимания циркуляции различных флавивирусов на территории России, способствует формированию коллекции современных изолятов арбовирусов и обеспечивает основу для их дальнейшего исследования. Все это в совокупности может иметь большое значение для развития методов генетической и иммунологической диагностики вирусных патогенов и обеспечит развитие диагностики современными референс штаммами флавивирусов. Развитие дальнейших исследований флавивирусных инфекций на этой основе может существенно расширить наши знания и представления в географии распространения флавивирусов на территории России.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Козловой А. А. «Изучение ареала вируса Западного Нила в европейской части России», дает все основания считать, что диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.02.02 – вирусология и является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном уровне, и соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор диссертации, Козлова Алина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Зав. отделом
молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
д.б.н., проф.


В.Б. Локтев

Подпись Локтева В.Б. заверяю.
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
к.б.н., доцент




О.А. Плясунова

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.
Д.б.н., профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов.

29.01.2022