

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу
Волынкиной Анны Сергеевны "Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса
Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих в Российской Федерации",
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность темы исследования

Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ) является острым вирусным природно-очаговым заболеванием человека с высокой степенью летальности и сравнительно широким географическим распространением вируса, охватывающим около 40 стран в Европе, Азии и Африке, в том числе южные территории европейской части России.

Наиболее высокий уровень заболеваемости ККГЛ за последние 15 лет зарегистрирован в России, Турции и Иране. Активизация очагов ККГЛ, начавшаяся в 1999 г. на территории юга России поддерживается до настоящего времени. За период времени с 1999 г. по 2017 г. на этой территории было выявлено более 2000 лиц, инфицированных вирусом ККГЛ, причём 4% заболеваний закончились летальным исходом.

Наблюдаемое постепенное расширение географического ареала распространения вируса ККГЛ, которое может происходить вследствие переноса вируса с инфицированными носителями и переносчиками на другие территории, а также появление новых генетических вариантов вируса за счёт рекомбинаций и реассортационного обмена сегментами между штаммами вируса ККГЛ обуславливают необходимость разработки и использования высокоспецифичных и экспрессных методов для идентификации и дифференциации изолятов вируса, выделенных от заболевших лиц.

К моменту начала диссертационной работы соискателя популяция вируса ККГЛ в России не была полностью охарактеризована. Перед эпидемиологами остро стояли задачи определить границы ареалов распространения генетических вариантов, выявить варианты вируса, характерные для различных регионов страны.

В этой связи работа Волынкиной Анны Сергеевны, посвящённая изучению генетического разнообразия, особенностей территориального распределения и эволюции вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих в России, является, несомненно, актуальным для здравоохранения России исследованием.

Степень разработанности темы исследования

К началу исследований соискателя были проведены молекулярно-генетические исследования вируса ККГЛ в различных лабораториях мира с целью определения нуклеотидных последовательностей сегментов генома вируса и разработки методов обнаружения и дифференциации изолятов этого вируса. В результате этих исследований в настоящее время определено 7 генетических линий вируса ККГЛ, в зависимости от территорий, на которых они выделены. Исследована циркуляция штаммов вируса ККГЛ генотипа Европа-1, причём в пределах этого генотипа установлено разделение российских

изолятов на три подгруппы. У трех российских штаммов были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности S, M и L сегментов генома.

Продemonстрированы случаи рекомбинаций и реассортационного обмена сегментами между штаммами вируса ККГЛ, ведущие к возникновению новых вариантов вируса. Доказана возможность переноса вируса ККГЛ с инфицированными носителями и переносчиками на другие территории и, как следствие этого расширения географического ареала генетических вариантов вируса.

С использованием филогенетических методов анализа построена модель глобального пространственно-временного распространения вируса ККГЛ.

Научная новизна диссертационного исследования.

В результате многоплановых исследований соискателя были существенно расширены представления о генетическом разнообразии изолятов вируса ККГЛ, циркулирующих на территории юга России. В частности, диссертанткой впервые описана новая генетическая линия вируса ККГЛ Европа-3, а в пределах генотипа Европа-1 описан новый генетический вариант Крым (Vd). Оригинальными являются и данные, свидетельствующие о протекающих между штаммами генетических подгрупп Ставрополь-Ростов-Астрахань-1 (Va), Волгоград-Ростов-Ставрополь (Vb) и Астрахань-2 (Vc) генотипа Европа-1 процессах реассортационного обмена сегментами генома. Естественно, что в результате процессов реассортации геномов будут возникать новые генетические варианты вируса с изменёнными биологическими свойствами, включая и варианты с повышенной вирулентностью и патогенностью.

Особого внимания заслуживает факт обнаружения соискателем на территории юга России изолята вируса ККГЛ генетической линии Африка-3. Обнаружение этого изолята по мнению соискателя свидетельствует о возможности заноса на территорию России штаммов вируса с других эндемичных по КГЛ регионов мира. С этим заключением нельзя не согласиться.

В итоге на территории России соискателем были выявлены изоляты вируса ККГЛ, относящиеся к трем генетическим линиям: Европа-1, Африка-3, Европа-3, и впервые охарактеризована генетическая структура популяции вируса ККГЛ на территориях Республик Калмыкия, Дагестан, Крым и Краснодарского края.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В процессе выполнения диссертационного исследования соискателем были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности геномов 20 изолятов вируса ККГЛ, относящихся к четырем генетическим подгруппам генотипа Европа-1, выявленным на территории России, а также установлены полноразмерные нуклеотидные последовательности S сегментов трех изолятов генотипа Европа-3 и одного изолята генотипа Африка-3. Результаты этих работ явились базисом для определения генетической гетерогенности популяции вируса ККГЛ в РФ, установления закономерности географического распределения генетических вариантов вируса ККГЛ на территории регионов юга европейской части России, а также для уточнения современных представлений об эволюционной истории вируса ККГЛ. На основе установленных

нуклеотидных последовательностей геномов и сегментов вируса ККГЛ соискателем разработаны методические рекомендации по проведению генетического типирования вируса ККГЛ. Полученные диссертанткой данные могут быть использованы в эпидемиологических исследованиях, а также для создания систем диагностики инфекции, вызываемой вирусом ККГЛ, и генотипирования изолятов этого вируса.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность результатов работы определяется использованием современных молекулярно-биологических методов исследования (выделение геномных РНК вируса ККГЛ, ОТ-ПЦР, секвенирование ДНК по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование ДНК), а также методов филогенетического и геоинформационного анализов. Работа выполнялась на репрезентативной выборке образцов сывороток крови больных КГЛ (более 500 образцов) и проб суспензий иксодовых клещей видов *Hyalomma marginatum*, *H. scupense*, *Rhipicephallus bursa*, *R. turanicus*, *Haemaphysalis punctata*, *Dermacentor marginatus* (более 100 суспензий), положительных на наличие РНК вируса ККГЛ, и собранных на территории 9 субъектов Южного и Северокавказского федеральных округов в 2007–2016 гг. Статистическая оценка достоверности результатов филогенетического анализа проведена с использованием соответствующих программ.

Всё выше изложенное свидетельствует о высоком профессиональном и методическом уровне исследования. Большой объем экспериментального материала и использование современных информативных методов анализа при исследовании генетического разнообразия и особенностей территориального распределения генетических вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих в России, а также теоретическое обобщение полученных данных позволили автору сформулировать основные научные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывают сомнений.

Диссертационная работа Волынкиной А.С. оформлена в соответствии с Национальным стандартом РФ (ГОСТ Р 7.0.11-2011), изложена на 165 страницах машинописного текста, имеет общепринятую структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов и списка литературы, включающего 186 источников, в т.ч. 28 отечественных и 158 зарубежных авторов.

Содержание диссертации характеризуется четким, последовательным изложением. Текст работы написан понятным литературным языком, содержит 10 таблиц и проиллюстрирован 19-ю наглядными рисунками, в том числе цветными. Выводы логически вытекают из полученных данных. Результаты исследования достаточно полно апробированы, докладывались на 6-ти всероссийских научных форумах и на 2-х международных конференциях, проходивших с 2012 по 2017 г.г. Основное содержание работы отражено в 22 научных публикациях, в том числе в журналах, входящих в Перечень, рекомендованный ВАК — 7. Все это позволяет высоко оценить

диссертационное исследование Волынкиной А.С. Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет.

Заключение

Кандидатская диссертация Волынкиной Анны Сергеевны "Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих в Российской Федерации", выполненная под научным руководством член-корреспондента РАН, д.м.н., профессора А.Н. Куличенко, является законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований изложены новые данные о генетическом разнообразии, особенностях территориального распределения и эволюции вариантов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующих в России. Диссертационная работа вносит значительный вклад в развитие эпидемиологии вируса ККГЛ и в создание высокоспецифичных методов детекции и дифференциации генетических вариантов вируса ККГЛ.

Диссертационное исследование по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842) с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а её автор, без сомнения, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник лаборатории
генной инженерии Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)
(Россия, 630117 г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2)
доктор биологических наук, профессор
эл. почта: beklem@niibch.ru



А.Б. Беклемишев

Личную подпись А.Б. Беклемишева заверяю

Начальник ОК ФГБНУ ФИЦ ФТМ



О.М. Минеева



27.11.2018 г.