

## ОТЗЫВ

официального оппонента Колясниковой Надежды Михайловны кандидата медицинских наук на диссертацию работу Сафоновой Марины Викторовны на тему «Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово (р.*Orbivirus*, сем.*Reoviridae*) на основе анализа его генетического разнообразия», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – «Вирусология» и 14.02.02 – «Эпидемиология».

Актуальность темы диссертационного исследования не вызывает сомнений и обусловлена широким распространением инфекций, передающихся клещами на территории Российской Федерации, и их весомым вкладом в структуру заболеваемости населения природно-очаговыми инфекциями. При этом, на территории нашей страны циркулирует большое число возбудителей трансмиссивных клещевых инфекций, в отношении которых не проводится эпидемиологический надзор, принадлежащих к группе малоизученных возбудителей, для которых неизвестен эпидемический потенциал и вклад в структуру заболеваемости населения.

Одним из таких малоизученных возбудителей является объект диссертационного исследования – вирус Кемерово. Вирус Кемерово был впервые выделен в 1962 г. группой советских и чехословацких ученых под руководством М.П. Чумаковым на территории Западной Сибири (Кемеровской области) – территории эндемичной по клещевому энцефалиту – из клещей *I. persulcatus* и ликвора от двух больных, госпитализированных с симптомами лихорадочной формы КЭ, возникшими после присасывания клещей. Была доказана полная антигенная самостоятельность нового, ранее неопisanного вируса (арбовируса), но после кратковременного периода активного изучения вирус Кемерово перешёл в разряд «забытых инфекций». В этой связи нельзя не сказать о значимости новых и возвращающихся инфекций, которые, как показывает опыт пандемии COVID-19, вызванной возбудителем новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, могут иметь серьёзные последствия для общества в целом.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе**

Представленная диссертационная работа свидетельствует, что цели и задачи, поставленные автором, отвечают теме диссертации, работа имеет понятный и последовательный план.

Научные положения и выводы, выносимые на защиту, обоснованы совокупностью научных результатов, полученных на основании анализа, приведенного по тексту теоретического и экспериментального материалов.

## **Достоверность и новизна результатов диссертационной работы**

Достоверность полученных автором результатов определяется широким спектром современных и адекватных для решения поставленных задач методов исследования – вирусологических, молекулярно-генетических, включая высокопроизводительное секвенирование с привлечением современных компьютерных программ для филогенетического анализа, использованием для сравнительного анализа полученных последовательностей генома с референтными последовательностями геномов орбивирусов, представленных в международной базе данных GenBank. Полученные данные корректно интерпретированы. Основные научные положения диссертационной работы прошли экспертизу при опубликовании в виде статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и в изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science, Scopus (опубликовано 7 статей), были доложены и обсуждены на трех российских научных конференциях, в том числе с международным участием.

Научная новизна диссертационной работы Сафоновой М.В. заключается в глубоком генетическом анализе вируса Кемерово: расшифровке полногеномных последовательностей 9 штаммов вируса (в том числе, для штамма, изолированного от человека с асептическим менингитом), установлении механизмов формирования его генетического разнообразия.

Автором получены данные, выявляющие не только внутривидовые, но и межвидовые взаимоотношения вирусов группы Грейт-Айленд, к которой относится объект исследования: впервые показано явление межвидовой сегментной реассортации между вирусами Трибеч и Муко.

Значительным нововведением является разработка бальной системы оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, позволяющая оценить степень эпидемиологической опасности возбудителя с оценкой ведущего фактора риска.

## **Личный вклад автора**

Личное участие автора в выполнении работы не вызывает сомнений. Автором произведён основной объём работ по диссертационному исследованию: получение штаммов вируса Кемерово в культуре клеток, экстракция РНК, пробоподготовка образцов для высокопроизводительного секвенирования, сборка геномов по референсной последовательности, а также весь последующий анализ полученных данных, включая аннотацию и депонирование последовательностей в базу данных GenBank. Также автором выполнена эпидемиологическая оценка полученных данных.

Следует отметить, что автор принимал участие в работах, предшествовавших собственному диссертационному исследованию и посвящённых изучению

распространенности вируса Кемерово в популяциях клещей на территории Российской Федерации.

**Теоретическая и практическая значимость результатов работы** заключается в создании базальной системы оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, как первой предложенной системы оценки степени эпидемиологической опасности непосредственно возбудителя, в том числе с неизвестной патогенностью для человека. Также автором разработана методика высокопроизводительного секвенирования РНК-содержащих вирусов с двухцепочечным геномом.

В международную базу данных GenBank депонированы 9 полногеномных последовательностей штаммов вируса Кемерово, включая полногеномный сиквенс уникального штамма, изолированного от человека с симптомами асептического менингита.

Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций в рамках семинара ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора «Инфекции, передающиеся клещами: современные требования и организация профилактических мероприятий».

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа построена по традиционному плану, изложена на 151 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, шести разделов собственных результатов исследования, заключения, выводов, изложения перспектив дальнейшей разработки темы, дополнена списком сокращений, списком использованной литературы, который включает 150 источников (36 отечественных авторов, 114 зарубежных) и 4 приложений. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 13 таблицами.

Во введении диссертации освещена актуальность выбранной темы, чётко сформулированы цели и задачи исследования, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, обозначен личный вклад соискателя, приведены сведения об апробации результатов исследования и о структуре диссертационной работы.

В обзоре литературы охарактеризована группа инфекций, передающихся клещами, проведён детальный анализ работ отечественных и зарубежных авторов, посвящённых объекту исследования – вирусу Кемерово – и другим родственным орбивирусам, дан обзор существующих методов секвенирования нуклеиновых кислот. Обзор содержит актуальные данные, логично построен и доступно изложен.

При этом автором сделан акцент на многообразии инфекций, передающихся клещами, нуждающихся в пристальном внимании учёных и специалистов

практического здравоохранения, а также на возможностях и особенностях применения современных молекулярно-биологических методов в изучении вирусных геномов.

В разделе «Материалы и методы» даётся описание основного объекта исследования – штаммов вируса Кемерово из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», и задействованных в работе методов. В работе реализуются несколько научно-исследовательских подходов, включающих классические вирусологические, молекулярно-биологические методы (экстракция нуклеиновых кислот, электрофоретическая детекция, постановка классической ПЦР, постановка ПЦР в реальном времени с использованием РНК-калибраторов, секвенирование по Сенгеру, высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina), обозначены некоторые подходы к биоинформатике и филогенетике реовирусов. Также раздел «Материалы и методы» содержит изложение основных принципов построения системы критериев оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной природы по балльной шкале.

Раздел «Результаты исследования» представлен шестью подразделами, каждый из которых характеризует основные области проделанной работы. Детально проанализированы полученные полногеномные последовательности штаммов вируса Кемерово, произведено сравнение с другими представителями группы вирусов Грейт-Айленд. Выполнена филогенетическая реконструкция внутривидовых взаимоотношений штаммов вируса Кемерово и межвидовых – внутри группы вирусов Грейт-Айленд, показаны явления как внутривидовой, так и межвидовой сегментной реассортации. Согласно полученным значениям нуклеотидной идентичности по второму сегменту, кодирующему последовательность белка VP3, вирусы Кемерово и Трибеч укладываются в заданные критерии принадлежности к одному виду. Автор заключает, что для окончательных выводов о таксономической принадлежности вирусов Кемерово и Трибеч необходимо проанализировать большее число штаммов, а также охарактеризовать возможность их симпатрической циркуляции и формирования реассортантных форм. Также проведено дополнительное исследование альтернативных открытых рамок считывания (ОРС) в сегменте 9. Предположение о роли альтернативных ОРС в сегменте 9 в детерминировании цитопатических свойств вируса Кемерово не нашло экспериментального подтверждения. Автором разработана система балльной оценки эпидемического потенциала природно-очаговых инфекций вирусной этиологии, на основании которой определена степень эпидемиологической опасности изучаемого вируса и выявлен ведущий фактор эпидемиологического риска. Также предложенная система балльной оценки эпидемического потенциала позволяет не только представить способность возбудителей к формированию эпидемического процесса, но и оценить удельный вес каждого из трех факторов эпидемиологической опасности, составляющих

компоненты эпидемического процесса (источник инфекции, пути передачи, восприимчивый организм).

Заключение обобщает полученные данные, из которых сформулированы выводы.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с установленными требованиями и полностью соответствует основным положениям диссертации.

Положительно оценивая представленную диссертационную работу Сафоновой М.В. необходимо, тем не менее, отметить ряд недостатков и задать несколько вопросов.

Есть несколько замечаний к оформлению работы и несколько вопросов:

- автор использует курсив при написании названий семейств, в том числе в названии работы, что является неверным, т.к. согласно общим принципам номенклатур биологических таксонов, курсив используется только для названий видов и родов; виды во множественном числе, имея аббревиатуру «spp.» принято писать без курсива (стр. 1, 5, 8, 85).

- на стр. 35 автор ошибочно называет семейство «Ixodes» вместо Ixodidae, правильным является род *Ixodes*, семейство Ixodidae.

- на стр. 4 в разделе «Введение» автор указывает 7 наиболее актуальных нозологий инфекций, передающихся клещами, за которыми осуществляется эпидемиологический надзор, хотя описывает 8.

- на стр. 9 в разделе «Научная новизна» (п.5) при оценке степени эпидемиологической опасности возбудителя автор употребляет термин «количественное выражение», что не совсем верно, т.к. речь идет о бальной шкале оценки эпидемического потенциала возбудителя. Также термин «количественная оценка» представлена на стр. 110 в названии таблицы №12.

- на стр. 9 в разделе «Практическая значимость и внедрения», когда автор пишет, что «Разработана количественная система оценки эпидемического потенциала возбудителей» целесообразно перефразировать на «Разработана бальная система оценки...».

- в разделе «Основные положения, выносимые на защиту» (п.1), а также «Выводы» (п.1) неясна фраза «в рамках глобального природного резервуара», что подразумевается под глобальным резервуаром?

- на стр. 20-25 в разделе «Обзор литературы» приведена таблица, где в графе «Природный резервуар» для некоторых инфекций (ККГЛ, Флебовируса, вируса Куаранфил, вируса Исфахан, вируса Кватта) указан «человек», хотя человек, как известно, является тупиковым хозяином для возбудителей природно-очаговых инфекций. Просьба пояснить.

- на стр. 27 перечисляются нозологии, если мы говорим о клещевом вирусном энцефалите как нозологии, то правильно сокращенно писать КВЭ или КЭ, а не ВКЭ (вирус клещевого энцефалита).

- в тексте диссертации нечетко представлена информации о клинической форме лихорадки Кемерово у больного, от которого удалось выделить штамм вируса Кемерово. Во введении дается информация, что это был асептический менингит, далее говорится о менингоэнцефалите, энцефалите, уточнить какая форма заболевания была непосредственно у больного. Согласно данным обзора литературы симптомы менингоэнцефалита были выявлены только у обезьян при заражении вирусом. Какой материал от больного человека использовался для выделения штамма вируса Кемерово (KEMV L75)?

- в литературном обзоре на с. 36 указано, что И.С. Михайлова (1974 г.) в своей диссертационной работе указывает, что «заражённость клещей вирусом Кемерово существенно не изменялась по годам и составляла 2,1-1,5%, что в 10-20 раз меньше заражённости клещей вирусом клещевого энцефалита», т.е. получается, что заражённость клещей вирусом КЭ в Кемеровской области достигает 20-40%. Это очень высокий показатель. Указывает ли И.С. Михайлова районы, где определяется такая высокая заражённость клещей вирусом КЭ и какой метод использовался для оценки инфицированности клещей?

- вероятно есть некоторая путаница в тексте на стр. 36 и в таблице №3 на стр. 38 в отношении заражённости разных видов клещей вирусом Кемерово в Курганской области. Просьба уточнить какие цифры являются верными.

- наименование штаммов в таблице №6 в разделе «Материалы и методы» и в целом по тексту и в таблице №9 не унифицировано, кроме того есть путаница с указанием штаммов в тексте на стр. 84, 85 и таблице №9.

- при формировании критериев оценки эпидемического потенциала возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной природы в таблице №8 в графе «Опасность восприимчивости макроорганизма» в столбце «Характер течения инфекционного процесса» автор приводит бальную оценку элементам фактора: «Неманифестное (бессимптомное) – 5 баллов, манифестное лёгкое – 4 балла, манифестное средней тяжести – 3 балла, манифестное тяжёлое – 2 балла, манифестное тяжёлое с летальным исходом – 1 балл», насколько корректна эта оценка? Не должно ли быть наоборот: манифестное тяжёлое с летальным исходом – 5 баллов и т.д.?

- автор употребляет слово «вирулентность» (с. 104) при описании репликативных свойств вируса в культуре клеток, что не соответствует определению термина. Данный термин используется, когда говорится о способности возбудителя вызывать заболевание или гибель организма. Как правило, нейровирулентность в отношении нейротропных вирусов оценивают на лабораторных животных, но не в культуре клеток. В выводах (п.6) также используется термин «вирулентность».

- автор неправильно орфографически пишет слово «вирусоформность» в тексте работы, когда говорит о зараженности клещей, слово «**вирусофорность**» пишется без буквы «м».

- в таблице №13 «Результаты оценки эпидемического потенциала возбудителей некоторых природно-очаговых инфекций» автор говорит об эпидемическом потенциале, рассчитывая сумму баллов. Есть ли информация о таких факторах как восприимчивый организм, обычная продолжительность инкубационного периода, характер течения инфекционного процесса, интенсивность распространения эпидемического процесса для малоизученных вирусов Муко, Парамушир, Луйо, Рестон, Хатанга, Вад-Медани, чтобы сформировать представление об эпидемическом потенциале на основе бальной системы оценки?

- в разделе «Научная новизна» в п.4 говорится о том, что «Обобщена и дополнена информация о циркуляции вируса Кемерово на территории Российской Федерации», в то время как в диссертации представлен литературный обзор по распространению вируса Кемерово, но не представлена дополнительная информация, либо на ней не сделан акцент.

- в автореферате есть несоответствие по описываемым штаммам в тексте и таблице №2.

- в диссертации (стр. 2, 11, 12, 17, 19, 29, 35, 39, 62, 69, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 104, 108, 109, 112, 121) и автореферате имеются мелкие орфографические, синтаксические, стилистические ошибки.

Тем не менее, указанные недостатки, не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

### **Соответствие паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспортам заявленных специальностей 03.02.02 – «Вирусология» и 14.02.02 – «Эпидемиология». Результаты, представленные в диссертационном исследовании, соответствуют пунктам 4, 8 и 9 паспорта специальности 03.02.02 – «Вирусология» и пункту 5 специальности 14.02.02 – «Эпидемиология».


### **Заключение**

Диссертационная работа Сафоновой Марины Викторовны «Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово (*p.Orbivirus*, сем.*Reoviridae*) на основе анализа его генетического разнообразия» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную с применением передовых методов и представляющую новые данные в изучении малоизвестного возбудителя лихорадки Кемерово, содержащую решение актуальных задач по совершенствованию подходов к изучению потенциально опасных инфекционных

агентов вирусной природы и предлагающую инструмент для оценки их эпидемического потенциала. По своей актуальности, научно-практической значимости, объему выполненных исследований, новизне, ценности полученных результатов и научных положений диссертация Сафоновой Марины Викторовны «Оценка эпидемического потенциала вируса Кемерово (р.*Orbivirus*, сем.*Reoviridae*) на основе анализа его генетического разнообразия», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, соответствует паспортам научных специальностей 03.02.02. – «Вирусология» и 14.02.02 – «Эпидемиология» и отвечает требованиям пп. 9-14, установленным Положением «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №650 от 29.05.2017 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; №1539 от 11.09.2021 г.), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а её автор Сафонова Марина Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – «Вирусология» и 14.02.02 – «Эпидемиология».

**Официальный оппонент:**

Заведующий лабораторией клещевого энцефалита  
и других вирусных энцефалитов, ведущий научный сотрудник  
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)  
кандидат медицинских наук, (03.02.02 – Вирусология)  
kolyasnikova\_nm@chumakovs.ru  
тел: +7 (495) 531-01-70 (доб. 32-47)

 Колясникова Надежда Михайловна

Подпись к.м.н. Колясниковой Н.М. удостоверяю.

Ученый секретарь ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита)  
кандидат биологических наук

«» 2022 г.

Белякова Алла Владимировна

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им.