

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу  
Ковалева Сергея Юрьевича «Происхождение, распространение и эволюция  
вируса клещевого энцефалита»,  
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук  
по специальности 03.02.02 – вирусология

Работа посвящена изучению вируса клещевого энцефалита, представителю семейства *Flaviviridae*, рода *Flavivirus*. Сам род объединяет в своем составе 53 различных вида РНК-содержащих вирусов, вирионы которых имеют липидную мембрану. Геном флавивирусов представлен одноцепочечной инфекционной РНК размером от 9500 до 12500 н.о., которая кодирует один полипротеин, который подвергается процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием индивидуальных структурных вирусных белков. 5'- и 3'-нетранслируемые районы геномной РНК весьма переменчивы и имеют длину около 130 и 400-700 н.о., соответственно. Флавивирусы способны инфицировать широкий круг организмов, который включает в себя членистоногих, млекопитающих, птиц, рептилий. Благодаря этому формируются природные очаги в разных географических регионах мира. Наиболее значимыми для человека флавивирусные инфекции обусловлены вирусами Денге, желтой лихорадки, японского энцефалита, Западного Нила, Зика, клещевого энцефалита. В большинстве случаев передача флавивирусной инфекции осуществляется переносчиком (вектором) – комаром или клещом. Этот фактор условно позволяет подразделить флавивирусы на комариные и клещевые, а также группу вирусов, для которых вектор не определен. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей флавивирусов подтверждает возможность такого разделения. Теории распространения флавивирусов по территориям учитывают климатические факторы, факторы смены хозяев и природно-экономическую деятельность человека. С одной стороны – это клещевые флавивирусы, связанные с морскими птицами, массовое гнездование которых имеется в Северном и Южном полушариях. При этом ареал клещевых флавивирусов во времени расширялся в сторону лисов Евразии, где основным хозяином становились клещи *Ixodes*. Другая гипотеза подразумевает, что большинство современных клещевых флавивирусов являются потомками вирусов, существовавших к концу ледникового периода. Его окончание изменило климатические условия и географию распространения членистоногих, птиц и млекопитающих в Евразии.

История изучения клещевого энцефалита (КЭ) насчитывает более 80 лет и до сих пор он остается проблемой здравоохранения стран Центральной и Восточной Европы, России, Китая, Монголии и Японии. Распространение вируса клещевого энцефалита на двух континентах определяет его генетическое разнообразие. Современная классификация вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) выделяет три субтипа – европейский, сибирский и дальневосточный. Заболевание, вызванное вирусами указанных субтипов имеет разную тяжесть и степень клинических проявлений. Резервуаром и

переносчиком ВКЭ являются клещи семейства *Ixodidae*. Мониторинг за ареалами распространения клещей, молекулярно-генетическое исследование изолятов ВКЭ может не только обеспечить совершенствование методов лабораторной диагностики, но и прогнозировать эволюцию вируса и его распространение.

Целью работы Сергея Юрьевича было разработать систему классификации вируса клещевого энцефалита в пределах субтипа и на основе комплексного подхода предложить гипотезу о времени происхождения, путях распространения и механизмах эволюции вируса клещевого энцефалита.

Для выполнения поставленной цели были поставлены следующие задачи.

1. Разработать систему дифференциации ВКЭ в пределах субтипа;
2. Определить факторы, влияющие на распространение ВКЭ в локальном и глобальном масштабе;
3. Предложить методические подходы эффективного мониторинга ВКЭ в природных очагах;
4. Установить филогеографическую структуру популяции таежного клеща *I. persulcatus* на основе анализа последовательностей фрагментов ядерной и митохондриальной рРНК;
5. Изучить популяции близкородственных видов иксодовых клещей в зонах симпатрии для выявления межвидовых гибридов;
6. Установить основные факторы, определяющие эволюцию ВКЭ, и предложить наиболее вероятный сценарий эволюционной истории ВКЭ;
7. Установить значение кросс-контаминации и (или) лабораторных ошибок в работе с клещевыми флавивирусами на премере референсного штамма *Soffin*. Обосновать необходимость генетической паспортизации коллекционных и вакцинных штаммов.

Задачи, которые автор ставил перед собой, в основном соответствуют положениям, выносимым на защиту, а полученные в ходе выполнения задач результаты отражены в выводах.

Представленная к защите Ковалевым С.Ю. диссертационная работа построена по классической схеме, изложена на 323 страницах и включает в себя: Список сокращений, словарь терминов и определений, введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы - 305 ссылок на работы отечественных (76 ссылок) и зарубежных (229 ссылок) авторов. Работа содержит 15 таблиц, 39 рисунков и 10 приложений.

В «Введении» представлены материалы, обосновывающие ее актуальность, цели и задачи исследования, научную новизну, положения выносимые на защиту.

**Обзор данных литературы** содержит информацию о характеристике вируса клещевого энцефалита, геноме вируса, о географическом распространении субтипов ВКЭ, проблемах генетической идентификации штаммов и методах типирования, существующие представления об эволюции ВКЭ.

**В Главе материалы и методы** исследования приводится перечисление использованных в работе образцов клещей, образцов сывороток крови и плазмы от больных клещевым энцефалитом, образцов тканей погибших от КЭ людей, количество штаммов ВКЭ. Так же представлены методы исследований – выделение нуклеиновых кислот, проведения полимеразной цепной реакции ВКЭ и фрагментов 28S рРНК и 12S рРНК клещей, секвенирования генома штамма ВКЭ, а именно штамма SofjinKSY, клонирования и скрининг-ПЦР продуктов при исследовании аллелей ITS2 клещей *I.persulcatus*, *I.pavlovskyi*, *I.ricinus*, указаны программы, использованные при филогенетическом анализе и структурном моделировании молекул РНК и белков, а так же метод расчета скорости нуклеотидных замен и оценка времени дивергенции штаммов ВКЭ. Судя по представленным в Главе материалам статистические метод обработки результатов не применялись.

**В третьей главе** описаны отдельные аспекты изучения распространения ВКЭ и результаты исследования искодовых клещей на территории России. Глава разбита на пять разделов, из которых 4 раздела связаны с описанием исследований ВКЭ и один раздел посвящен исследованию таежного клеща. Представленные результаты и обсуждение этих результатов с данными литературы интересны. На основании результатов данной главы автором делаются пять из восьми выводов диссертационной работы. Однако к полученным результатам, их изложению и интерпретации есть ряд вопросов и замечаний, которые представлены ниже.

**В четвертой главе** Сергей Юрьевич описывает свои подходы к пониманию популяционной структуры и эволюции ВКЭ. Два раздела посвящены кластерной структуре популяций ВКЭ, один раздел описывает квантовую теорию эволюции ВКЭ и один раздел описывает возможность существования межвидовых гибридов у трех видов искодовых клещей.

**Работа завершается заключением**, содержащим анализ и обобщение полученных результатов.

Материалы работы опубликованы в 12 научных статьях и разделе в монографии, статьи в изданиях, рекомендованных ВАК. Апробация работы проводилась на международных и всероссийских научных конференциях с 2004 года.

Текст автореферата и представленные в нем результаты соответствует материалам, изложенным в диссертационной работе.

## Замечания.

При оппонировании диссертационной работы С.Ю. Ковалева к тексту и результатам представленной работы имеются ряд замечаний, которые суммированы по разделам.

## Обзор литературы.

Описывая переносчиков ВКЭ автор подробно остановился на ареалах распространения представителей рода *Ixodes* – а именно *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* и *I. ricinus* при этом практически не упомянув других представителей семейства *Ixodidae* и в частности рода *Dermacentor*. В отношении представителей рода *Dermacentor* известно, что в настоящее время частота выявления антигена ВКЭ или ВКЭ в этих клещах достаточно высока. При этом ареалы распространения *Dermacentor* во многом совпадают с ареалом распространения рода *Ixodes*, так же отмечается выявление *Dermacentor* в более высоких широтах. Разрабатывая концепцию квантовой эволюции ВКЭ автор связывает «перестройку вирусного генома с результатом смены вирусом основного хозяина (клеща)». В качестве таких «хозяев» используются клещи *I. persulcatus*, *I. pavlovskiy* и *I. ricinus*. В связи в разделе обзора литературы, посвященном зонам симпатрии и репродуктивной изоляции следовало дать более четкое и подробное обоснование в отношении именно этих клещей как переносчиков ВКЭ, и почему другими представителями рода *Ixodes* можно пренебречь.

- На основании результатов собственных исследований (глава 3) Сергей Юрьевич делает выводы 1 и 2. В связи с этим в обзоре литературы было бы уместным дать информацию о «колонизации» Сибири, указав временные сроки «колонизации», возможные ссылки на источники, отмечающие проявления у переселенцев «непонятных заболеваний», что могло косвенно служить подтверждением о возможных контактах с переносчиками клещевого энцефалита. Так же в обзоре литературы нет подробной информации о Всесоюзной программе по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц. Уместным было бы отразить каких животных, сколько, когда и куда было переселено. Насколько эти животные являются источником прокорма клещей или их переносчиком. Есть ли информация, сколько и каких клещей удастся определить на «переселенных» животных в дикой природе.

- В разделе обзора литературы, касающегося существующих представлений об эволюции ВКЭ, Сергей Юрьевич обсуждает три гипотезы происхождения и распространения ВКЭ. Эти гипотезы иллюстрируются рисунком 1.4. Необходимо отметить, что не Zanotto с соавторами, ни Heinze с соавторами не рассматривали в своих работах только ВКЭ. Zanotto анализировать арбовирусы в целом, не упоминал об иксодовых клещах. Его «гипотеза»

пожет быть проиллюстрирована рисунком 1.4.Б (а не 1.4.А). Heinze достаточно убедительно продемонстрировал наличие нескольких «коридоров» во временном и географическом распространении флавивирусов, ассоциированных с клещами. При этом часть «гипотезы» Heinze достаточна близка результатам, демонстрируемым С.Я. Ковалевым в Главе 3 диссертации. В связи с этим следовало больше внимания уделить обсуждению статьи Heinze как в обзоре литературы, так и в Заключение.

#### **Материалы и методы исследования.**

- Раздел не дает четкой характеристики использованных в работе образцах содержащих, или не содержащих ВКЭ. Нет четкого деления - сколько клещей (и каких, с указанием рода и вида) было исследовано индивидуально и сколько в пулах (из чего состояли пулы – из клещей одного вида? Из разных видов? Сколько клещей было в каждом пуле). Поскольку в исследования были взяты клещи из разных административных и географических регионов, и даже из-за рубежа – сколько конкретно клещей было получено из каждого региона, каких.

- Поскольку материалы диссертационной работы в определенной ее части основываются на изучении клещей *I.persulcatus*, *I.pavlovskiyi*, *I.ricinus* необходимо было указать, как проводилась идентификация этих клещей – какими методами и где – в месте выполнения работы или в местах сбора клещей.

- В части клинического материала так же нет точных указаний – сколько сывороток, образцов плазмы крови, материалов аутопсии было получено. Как у «больных» клещевым энцефалитом был подтвержден клинический диагноз.

- В части, касающейся изучения изолятов ВКЭ (по данным Главы – 500 штаммов ВКЭ) – где эти штаммы были изолированы, какова их пассажная история. Эти данные важны для анализа полученных в ходе работы с этими штаммами результатов, поскольку, по мнению самого автора, смена хозяина (или субстрата накопления) может приводить к нуклеотидным заменам.

- При описании кДНК 446 изолятов вируса отсутствует информация об источнике получения генетического материала и способах его изоляции для проведения описанных в работе исследований, как проводилась обратная транскрипция.

- при проведении амплификации фрагмента гена Е вируса клещевого энцефалита использовался ОТ-ПЦР, описанная в 2003 году Терновым В.В. и соавторами с незначительными модификациями автора. Терновой В.В. использовал двухраундовую ПЦР. На стр. 80 Сергей Юрьевич указывает, что в настоящей работе была предложена простая однораундовая мультиплексная ОТ-ПЦР. Необходимо конкретно указать, какие модификации предложены автором.

- В данном разделе диссертационной работы упомянуты два штамма, которые были получены из инактивированных вакцин российских производителей. Согласно таблице 3.2. речь идет о вакцинах клещевого

энцефалита производства ФГУП «НПО «Микроген» (Томский филиал «Вирион») и ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова». Первая вакцина является жидким сорбированным на гидроокиси алюминия препаратом. Вторая вакцина – лиофильно высушенная. Необходимо подробно описать методы выделения РНК из указанных вакцин.

- Понятие «Расчет скорости нуклеотидных замен», скорее всего не самое точное определение в данном случае (Раздел 2.2.5, стр. 76, 77) . Речь, скорее всего, идет о частотах возникновения нуклеотидных замен в вирусных генах. В любом случае, очень важно знать длину (количество нуклеотидов) анализируемых фрагментов. Такая информации в разделе не представлена. Она важна для сравнительной оценки получаемых значений и определения достоверности получаемых значений.

Из материалов данной главы следует, что при проведении работы использовались только молекулярно-биологические методы и компьютерная обработка данных. Для первичной характеристики образцов не применялись диагностические наборы для определения антигена ВКЭ или наборы реагентов для определения РНК вируса ВКЭ. В этом случае речь идет о зарегистрированных в России наборах реагентов, которые могли бы быть определенным референсом при изучении изолятов.

**Глава третья** «Отдельные аспекты изучения распространения и эволюции клещей *I.persulcatus* на территории России включает в себя в том числе результаты применения «мультиплексной ОТ-ПЦР для генотипирования ВКЭ с типоспецифическими праймерами».

Структура праймеров представлена в таблице 2.1. в главе Материалы и методы. Однако четкого изложения протокола проведения самой реакции нет. На странице 81 приводится рисунок 3.1. иллюстрирующий результат учета проведенной ПЦР с типоспецифическими праймерами. Не описан источник получения «прототипных» штаммов Sofjin и Absettarov, использовался ли автором при проведении выделения РНК контроль выделения, использовался ли при постановки каждого исследования положительный контроль (и если Да – то что именно). Как была предварительно оценена «специфичность» используемого протокола, можно ли каким-то образом оценить его «чувствительность»? Какие условия являются оптимальными, о наличии которых автор упоминает в первом абзаце на странице 81.

- Проводилось ли сравнение предложенного автором протокола с зарегистрированными в России наборами для молекулярно-генетической детекции ВКЭ (например – наборов Ампли Сенс)? Данной информации в работе не представлено.

- Нет указания, откуда были получены исследованные 167 образцов (Свердловская область?) и все эти образцы оказались положительными в ОТ-ПЦР с диагностическими праймерами, но при проведении типирования субтипа удалось типировать только 84 образца. Из которых 80 были отнесены к Сибирскому субтипу, 3 – к Европейскому субтипу и 1-

смешанный Европейско-Сибирский. Такой результат не смущает автора и далее – страница 83 – он пишет о исследовании генетического разнообразия ВКЭ на территории Среднего Урала на основе указанных образцов. При секвенировании все 84 образца оказались Сибирского субтипа. Причина такого расхождения между результатом полученным в ПЦР и при определении нуклеотидной последовательности, по мнению автора, отжиг праймера, специфичного для ВКЭ-европейского субтипа при амплификации Сибирского субтипа. Тем не менее, получив «положительный» результат по типированию Сибирского субтипа в 50,3% изученных образцов автор заключает, что на территории Среднего Урала, представленного Свердловской областью, распространен исключительно ВКЭ-Сиб.

- Раздел главы посвященный происхождению и распространению вируса клещевого энцефалита ВКЭ-СИБ на Среднем Урале, в европейской части России и в Прибалтийских странах – интересен, но не хватает доказательной базы, которая бы подтвердила предложенный автором путь «распространения» Сибирского субтипа ВКЭ из Западной Сибири (хотя предложенный автором путь не противоречит описанному Heinze).

Более убедительным было бы изучение «изолятов» собранных на одних и тех же территориях (с четким позиционированием по месту сбора и виду клеща) в течение длительного времени (до 27 лет), что могло подтвердить «скорость хода молекулярных часов», рассчитанную автором.

Утверждения о распространении ВКЭ по территории Сибири, Урала и Северо-Запада России по транспортным путям и распространении штаммов ВКЭ через реализацию долгосрочных государственных программ по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц носят предположительный и гипотетический характер. Доказательная база явно недостаточна.

Отдельные вопросы и замечания по результатам представленным в разделе 3.4. данной главы. Результаты данного раздела позволили соискателю сделать шестой вывод диссертационной работы, а именно – «дано обоснование необходимости обязательной генетической паспортизации коллекционных и вакцинных штаммов ВКЭ для выявления кросс-контаминации и [или] лабораторных ошибок.»

Прежде всего, рекомендации контроля генетической стабильности штаммов, используемых для производства иммунобиологических препаратов – в том числе и вакцин – даны в протоколах ИСН еще в 1998 году. Как требование к оценке производственных штаммов это закреплено в XIII Государственной фармакопеи. В части вакцин клещевого энцефалита европейские производители публиковали наблюдение за генетической стабильностью штаммов Niederfell и К-23 на всем сроке их использования в производстве.

Отечественные производители вакцин клещевого энцефалита генетический контроль за штаммами «Софьин» и «205» («ИПВЭ им. М.П. Чумакова» и «Вирион» Томск) проводят на основании регламентов производства. Результаты длительного изучения генетической стабильности штамма «Софьин» опубликованы «ИПВЭ им. М.П. Чумакова» в 2015 году (Vorovith

M.F. et al, Genetic description of tick-borne encephalitis virus strain Sofjin with longest history as a vaccine strain., SpringerPlus, 4:761). В этой статье авторы обсуждают свои результаты с данными о штамме Софьин, опубликованными С.Ю. Ковалевым, выражая свое несогласие с диссертантом. В представленной диссертации об опубликованных материалах «ИПВЭ им. М.П. Чумакова» не упоминается. Что касается штамма “SofjinVT1999”, РНК которого была выделена из готовой формы вакцины клещевого энцефалита производства «Вирион» Томск, то эти результаты не менее дискуссионны. Томский филиал «НПО «Микроген» никогда не использовал для производства вакцины штамм «Софьин» (или в интерпретации соискателя - “SofjinVT1999”). Все серии вакцины клещевого энцефалита с момента освоения производства произведены с использованием штамма «205». «НПО «Микроген» изучил генетическую стабильность указанного штамма и его последовательность представлена в GenBank под номером JX987280 с февраля 2013 года.

В диссертации нет информации, в каком году проводилось выделение РНК из серий вакцин и изучении нуклеотидной последовательности штаммов “SofjinVT1999” и “SofjinVM2001”. В том случае, если эта работа проводилась после срока годности данных препаратов, то как условия и длительность хранения могли отразиться на «качестве» препаратов РНК. Странно, что автор безапелляционно назвал штамм, используемый для производства вакцины в Томском филиале «НПО «Микроген», «Софьин», если на вкладыше к вакцине указана информация, с использованием какого штамма она произведена. Автор не провел сравнение полученных им последовательностей «вакцинных» штаммов с последовательностями штаммов Софьин и «205» имеющихся в свободном доступе.

Все выше перечисленное делает шестой вывод диссертации не правомочным.

#### **Глава четвертая «Популяционная структура и эволюция ВКЭ».**

Предложенный автором кластерный подход для дифференциации популяции ВКЭ остроумен и не лишен оригинальности. Однако, данные по кластерному подходу и сам кластерный подход должны быть формализованы в виде стандартного метода или пакета соответствующих программ. Это позволит проверить возможность использования данного подхода для анализа других вирусных последовательностей и определить возможные рамки его применения. Это в равной мере относится и к концепции квантовой эволюции ВКЭ. Пока же представленные подходы можно трактовать как новые предположения выдвинутые диссертантом. Правомочность широкого использования этих подходов для исследования ВКЭ не очевидна и нуждается в подтверждении дополнительными данными. Так, иллюстрируя кластерный подход на примере распределения кластеронов на территории Свердловской области, автор уделил достаточно внимания кластеронам 3Q, 3O, 3I. Сложно воспринять доказательную базу автора, который описывая результаты ссылается на материалы Приложения YI. На примере кластерона 3Q необходимо отметить, что либо в приложении



УИ не точность и указан не год выделения, а год изучения, но если это в самом деле год выделения «изолятов» - то все рассуждения автора не состоятельны. Нельзя проводить рассуждения и делать выводы описывая строительство дороги в 1975 -1985 годах и связывая именно с этой деятельностью распространения кластерона 3Q при этом проводя изучение «изолятов» собранных на этой территории в 2009 году. Если в самом деле изоляты были собраны в годы строительства дороги (1975-1985, 5 изолятов), а изучены только в 2009 году, то в этом случае уместен вопрос автору – до строительства дороги на указанных территориях были ли собраны и изучены образцы ВКЭ? По завершению строительства дороги (после 1985 года) собирались ли образцы ВКЭ по трассе Екатеринбург-Серов?

- Отражая результаты, изложенные в четвертой главе, в четвертом выводе, автор указывает на разработанные теоритические принципы перманентного мониторинга вирусных популяций на разных территориальных уровнях. Сами принципы изложены на стр. 165 и являются тезисами, в которых нет четких критериев и определений кластерона, количественного состава, качественного состава, максимально возможной выборки образцов, что есть определенный период времени мониторинга.

- В разделах этой главы, посвященных гибридизации клещей комплекса *I. ricinus* в природных популяциях в зонах их симпатрии приводятся результаты гибридизации клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в симпатрических популяциях Западной Сибири и гибридизации клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* в симпатрических популяциях на территории Эстонии. Сами исследования и полученные результаты интересны, однако несколько отличаются методологическим подходом – при проведении работ в Эстонии кроме изучения генетических признаков проводилась и видовая принадлежность по морфологическим признакам. В случае же изучения *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* отловленных на флаг в Западной Сибири морфологические признаки не изучались.

По совокупности указанных замечаний диссертация Сергея Юрьевича Ковалева по содержанию, научно - практической значимости, новизне и методическому уровню не является научно - квалификационной работой и не соответствует требованиям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842", а ее автор не заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Заместитель директора  
ФГУП СПбНИИВС ФМБА России  
д.м.н., профессор

Г.М. Игнатьев

Подпись Игнатьева Г.М. заверяю

Начальник отдела кадров

Дмитриева Н.В.

