

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Е.И. Ярыгиной на диссертационную работу Силуяновой Элины Владимировны на тему **«Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А(Н3N2) и В в период 2003-2013 гг. в РФ»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы

Среди болезней вирусной этиологии грипп занимает особое место. Изучение молекулярной эволюции вирусов гриппа предоставляет важную информацию по их генезису и особенностям распространения в разных странах мира. Ежегодно вирусы гриппа вызывают эпидемии в обход уже существующему иммунитету благодаря постоянной мутационной изменчивости (антигенный дрейф) в гемагглютинине (НА), т.к. он является основной целью для антител, а также изменениям в нейраминидазе (NA) и М-белке, связанных с чувствительностью к противовирусным препаратам. Поэтому большинство исследований молекулярно-генетического строения НА, NA и М-белка посвящено их эволюционным изменениям, в результате появления новых значимых мутаций.

Исследования филогенетических дендрограмм домена NA1 гемагглютинина подтипа Н3 показали, что эволюционная изменчивость вируса гриппа А(Н3N2) была представлена в виде кактус - подобной структуры, в которой большинство генетических линий исчезает в течение нескольких лет их циркуляции и только одна линия продолжает существовать между эпидемиями.

Вирусы гриппа В также представляют определённый интерес, т.к. являются активными участниками многих эпидемических процессов. С 1988 г. произошло «раздвоение» популяции вируса гриппа В на две антигенно различные ветви - В/Виктория/2/87-подобные и В/Ямагата/16/88-подобные. С тех пор вирус гриппа В эволюционирует двумя социркулирующими эволюционными линиями.

Для детального молекулярно-генетического анализа изолятов вируса гриппа целесообразно разработать и применять на практике методы определения первичной структуры генома, а также нуклеотидных последовательностей фрагментов генов, включающих генетические маркеры вируса.

Следовательно, работа Силуяновой Э.В. посвящена актуальной проблеме – так как целью работы было изучить молекулярно-генетические характеристики и особенности эволюционной изменчивости вирусов гриппа

А(Н3N2) и В, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в период 2003-2013гг. в России.

Для достижения указанной цели перед диссертантом было поставлено 6 задач:

1. Определить доленое участие вирусов гриппа А(Н3N2) и В в период эпидемических подъемов заболеваемости 2009-2013гг.
2. Подобрать репрезентативную выборку штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, циркулировавших в РФ в период 2003-2013гг., для изучения их эволюционной изменчивости.
3. Разработать протоколы секвенирования генов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, кодирующих НА, NA и М-белок. С использованием разработанных протоколов получить геномные данные для изучаемых штаммов.
4. Модифицировать и адаптировать лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий вируса гриппа В, с учётом особенностей циркулирующих в настоящее время штаммов.
5. На основе анализа полученных нуклеотидных последовательностей эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и В, идентифицировать в NA и М2-белке мутации, ответственных за устойчивость к противовирусным препаратам.
6. На основе полученных данных провести филогенетический анализ исследуемых штаммов вируса гриппа А (Н3N2) и В.

Автор успешно справилась с поставленными задачами.

Содержание работы. Представленная диссертационная работа построена по традиционному плану: изложена на 166 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, первая из которых содержит описание использованных материалов и методов, а вторая и третья - изложение результатов собственных исследований. Затем следуют разделы «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список литературы», включающий 25 работ отечественных и 186 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 21 рисунком и содержит 26 таблиц.

Раздел «**Введение**» автор посвящает актуальности изучаемой проблемы, определяет цель и задачи исследований, формулирует научную новизну и научно-практическую значимость работы, заявляет основные положения диссертационной работы, выдвигаемые на защиту, оценивает личный вклад соискателя, сообщает необходимые сведения публичных сообщений по теме работы, раскрывает структуру и объем диссертации.

Следует отметить, что материалы диссертационной работы были широко представлены научной общественности на международных симпозиумах и конференциях: International Conference ISIRV Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management (Hanoi, Vietnam, 2012); X и XI Научно-практической конференции «Инфекционные болезни и антимикробные средства», Москва, 2012, 2013; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013», Москва, 2013; International Conference Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, South Africa, 2013; XII Конгресс детских инфекционистов России, Москва, 2013.

«Обзор литературы» начинается с главы 1, в которой автор сообщает сведения о классификации вируса гриппа.

Большое внимание уделено соискателем структуре вириона вируса гриппа – описаны строение вириона, его геном, структурные и неструктурные белки, их функции.

Глава 2 «Характеристика вируса гриппа А (H3N2)» начинается с исторической справки, в которой описано происхождение данного вируса. Затем диссертант дает антигенную характеристику штаммов вируса гриппа А (H3N2), циркулирующих в мире и в РФ с 2003 по 2013 гг.

Далее автор анализирует молекулярно-генетическое строение генов НА, NA и М-белка вируса гриппа А (H3N2).

Отражены в «Обзоре литературы» и данные о влиянии изменений в последовательностях НА, NA и М-белка на свойства вируса гриппа А (H3N2). Автор подробно описывает замены в последовательностях белка нейраминидазы, связанные с резистентностью к лекарственным препаратам.

Глава 3 «Обзора литературы» посвящена антигенным характеристикам вируса гриппа В и молекулярно-генетическому строению НА и NA данного вируса.

В «Заключении по обзору литературы» автор подтверждает и обосновывает необходимость изучения молекулярно-генетических характеристик и особенностей эволюционной изменчивости вирусов гриппа А (H3N2) и В, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в период 2003-2013гг. в России.

В главе 1 раздела 2 **«Результаты собственных исследований»** подробно описаны штаммы вирусов гриппа, а также перечислены методы, которые автор использовала для проведения научно-исследовательской работы по теме диссертации.

Непосредственно результаты собственных исследований представлены в главе 2 раздела 2 «**Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших на территории России с 2003 по 2013 гг.**» и начинаются с п. 2.1 «Активность вируса гриппа А(Н3N2), как этиологического агента эпидемических подъемов заболеваемости в период 2009-2013гг.». В этом пункте диссертант сообщает, что появление в 2009 г. в активной циркуляции пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 изменило долевое участие штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В в эпидемическом процессе в РФ: А(Н3N2) был не активен в сезоне 2009-2010 гг. и доминировал только в 2012-2013гг. Детальное типирование 32 штаммов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных в 2010-2011 гг., определило родство 29 из них с вакцинным вирусом - А/Перт/16/2009 (Н3N2) и только 3 штамма представляли собой его антигенные варианты. Детальное типирование 115 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) сезона 2011-2012 гг. определило их родство с эталоном А/Перт/16/2009. Антигенный анализ, проведённый в отношении 108 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) сезона 2012-2013 гг. показал, что популяция на 88% была близкой по родству с другим эталонным вирусом - А/Виктория/361/2011. Автор делает заключение, что по антигенным свойствам популяция циркулировавших штаммов была близкородственной эталонным вариантам А/Перт/16/2009 и А/Виктория/361/2011, которые входили в состав гриппозных вакцин в соответствующие сезоны.

В п. 2.2 дана характеристика 70 штаммов вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных на отдельных территориях РФ в 2003-2013 гг. и отобранных для молекулярно-генетического анализа. Показано, что изучаемые штаммы отражали изменчивость вируса гриппа А(Н3N2) по антигенным свойствам и принадлежали к шести эталонным вариантам: А/Панама/2007/1999, А/Кумамото/102/2002, А/Висконсин/67/2005, А/Брисбан/10/2007, А/Перт/16/2009 и А/Виктория/361/2011.

В п. 2.3 «Молекулярно-генетический анализ гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2)» представлены результаты подбора универсальных праймеров для амплификации и последующего секвенирования полноразмерных последовательностей гена НА. В результате согласно предложенной схеме была осуществлена амплификация 3 отдельных перекрывающихся участков гена НА, которые в ходе реакции секвенирования складывались в единую последовательность, что позволило диссертанту провести дальнейший молекулярно-генетический анализ гена НА.

Далее диссертант описывает общие и уникальные замены, выявленные во время исследований аминокислотной последовательности гемагглютинаина штаммов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных в 2003-2013 гг., в сравнении с

последовательностями эталонных/вакцинных штаммов. Показано, что основные изменения затронули субмолекулу HA1 (глобулярная часть HA), чаще всего в антигенных сайтах A и B. Автор делает заключение, что именно эти сайты в большей мере подвержены действию положительной селекции, нежели сайты C, D и E.

Затем автор провела филогенетическое сравнение последовательностей генов гемагглютинина исследуемых штаммов и сделала вывод о том, что они разделились на две ветви: в первую вошли штаммы сезона 2003-2004 гг., наиболее близкие эталонному штамму A/Фуцзянь/411/02, с общей для всех заменой G479E в HA; вторую составили штаммы, с характерными заменами Y159F и S189N в антигенном сайте B и S227P, которые были также найдены и у репрезентативного штамма A/Веллингтон/1/04 в последовательностях HA.

Изменения в последовательностях HA у штаммов, циркулировавших в период с 2004 по 2009 гг., определили их филогенетическую принадлежность к клайду A/Брисбан/10/07.

Штаммы, выделенные во Владивостоке в 2010-2011 гг., претерпели значительные мутационные изменения и представляли новый клайд A/Перт/16/09 - подобных вирусов с ключевыми заменами I260M и R261Q в последовательностях HA.

Следовательно, филогенетическое сравнение последовательностей генов гемагглютинина исследуемых штаммов показало, что они близки эталонным вариантам, рекомендованным экспертами ВОЗ в качестве вакцинных в соответствующие сезоны.

Результаты молекулярно-генетического анализа гена NA эпидемических штаммов вируса гриппа A(H3N2) представлены в п. 2.4. Автор сначала провела подбор праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена нейраминидазы, затем изучила аминокислотный состав данного белка и сделала вывод, что за десять лет последовательность нейраминидазы претерпела значительные изменения. Как и в последовательностях HA были замечены замены в NA, связанные с приобретением и потерей потенциальных сайтов гликозилирования.

В п. 2.5 Элина Владимировна представила молекулярно-генетический анализ гена белка M эпидемических штаммов вируса гриппа A(H3N2) и сделала заключение, что филогенетическая дендрограмма последовательностей белка M демонстрирует поэтапное разделение штаммов вируса по группам в зависимости от периода циркуляции и эталонного штамма.

Глава 3 «Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших на территории России с 2003 по 2013 гг.» содержит сведения о частоте детекции вирусов гриппа В в клиническом материале в период 2009-2013 гг. Показано, что штаммы вируса гриппа В вызвали вторую волну подъема заболеваемости в феврале-апреле 2010 г., определив моноэтиологичность эпидемии, где их долевое участие составило 5,5%. В 2010-2011 гг. на долю вируса гриппа В пришлось 17,0 %, в 2011-2012 гг. их долевое участие составило В 27,0 %, а в 2012-2013 гг. 22 %.

Молекулярно-генетический анализ, проведённый в отношении штаммов вирусов гриппа В В/Ямагатской и В/Викторианской линий, циркулирующих с 2003 по 2013 гг. показал, что в этот период эволюционная изменчивость вирусов гриппа шла одновременно по двум линиям – В/Ямагата и В/Виктория. За исследуемый период в последовательностях гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа В были установлены важные аминокислотные замены в четырех антигеннозначимых областях. Наибольшее количество замен было зафиксировано в петле 120, что подтверждает факт того, что именно эта область подвергается большому действию позитивной селекции.

На следующем этапе работы над диссертацией автор приступила к модификации лабораторного варианта тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий гриппа В (Barbara Viere, 2010), т.к. участок НА, на который были подобраны зонды, российских штаммов вируса гриппа В имел отличия от последовательности НА штаммов, подобранных для разработанной тест-системы. Также был заменен краситель для детекции вирусов гриппа В/Викторианской линии (Vic на FAM). Праймеры, используемые для амплификации, подошли для всех исследуемых российских штаммов.

Модифицированный вариант тест-системы был апробирован с использованием панели вирусов гриппа В из коллекции вирусов лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ, а также 20 образцов носоглоточных смывов от пациентов Инфекционной больницы №1, которая является опорной базой Центра экологии и эпидемиологии гриппа.

Четырнадцать образцов носоглоточных смывов были протестированы параллельно тест-системой «ДНК-технологии» и лабораторным вариантом тест-системы. Полученные результаты оказались аналогичными: семь образцов принадлежали В/Ямагатской и семь В/Викторианской линии.

В главе «Обсуждение результатов» диссертант сравнивает собственные результаты с результатами других исследователей, опубликованными в научных источниках.

Научная новизна.

1. Определено доленое участие вирусов гриппа А(Н3N2) и В в этиологии эпидемических подъемов заболеваемости в период 2009-2013гг., особенности их антигенных, биологических и молекулярно-генетических свойств, направления эволюционной изменчивости в период 2003-2013гг. в РФ.
2. С использованием разработанных протоколов для секвенирования полноразмерных генов, кодирующих НА, NA и М-белок, определены молекулярно-генетические характеристики изучаемых штаммов.
3. Определены специфические замены в последовательностях НА (Т10М, Q57Н, V182I) и NA (P154S, T434N) штаммов вируса гриппа А(Н3N2), характерные только для российских штаммов.
4. Модифицирован лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации двух эволюционных линий вируса гриппа В (В/Виктория-подобных и В/Ямагата-подобных) с использованием двух специфических зондов IBHУpr и IBHVpr, меченных красителями FAM и HEX.
5. Составлены сравнительные филогенетические дендрограммы последовательностей НА, NA и М-белка штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, выделенных на территории РФ и в других странах мира, в том числе рекомендованных экспертами ВОЗ в качестве эталонных.

Практическая значимость работы состоит в том, что получены молекулярно-генетические характеристики циркулировавших на территории РФ в период 2003-2013гг. штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, которые являлись основанием для замены вакцинных штаммов и рекомендацией к использованию противовирусных препаратов.

Модифицирован лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени с использованием двух зондов (IBHУpr и IBHVpr) для дифференциации эволюционных линий вирусов гриппа В, что позволило уточнить доленое участие штаммов вирусов гриппа В в эпидемическом процессе.

Данные о генетических маркерах чувствительности к противовирусным препаратам были представлены на сайт Европейского Регионального Бюро ВОЗ (<http://www.euro.who.int>).

Полноразмерные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих гемагглютинин (НА), нейраминидазу (NA) и матриксный белок (М) штаммов

вирусов гриппа А(Н3N2) были депонированы в базу GenBank (JQ988024-JQ988050).

В период 2009-2013гг. 39 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и 59 штаммов вируса гриппа В были переданы в два Международных центра по гриппу, сотрудничающих с ВОЗ - Национальный Институт по медицинским исследованиям (NIMR), Лондон, Великобритания и Отдел гриппа Центров по контролю за заболеваемостью и профилактике (CDC&P). Атланта, США для включения в международный мониторинг и выработке рекомендаций по составу гриппозных вакцин.

Диссертация завершается восемью выводами, которые основаны на результатах выполненной работы.

В автореферате и 14-ти опубликованных статьях отражено основное содержание диссертации.

Не смотря на высокую оценку работы, при ознакомлении с ее содержанием возникли вопросы и пожелания:

1. Отсутствие схемы геномной карты вируса гриппа А и структуры гемагглютинина (с антигенными сайтами) усложняет восприятие изложенного материала.

2. Автор на протяжении всей диссертационной работы делает заключение, что исследуемые изоляты вирусов гриппа близки эталонным вариантам, рекомендованным экспертами ВОЗ в качестве вакцинных в соответствующие сезоны. Чем это можно объяснить?

3. Путаница в нумерации таблиц. В диссертации имеют место по две таблицы под № № 1 – 6. После таблицы 13 идёт таблица 18. Таблицы под номерами 14 – 17 отсутствуют. Итого в диссертации 26 таблицы, а не 20, как сказано в «Структуре и объёме диссертации».

4. Путаница в нумерации рисунков. Под рисунками 3 (стр. 26) и 5 (стр. 29) отсутствуют названия. Рисунок 4 находится после рис. 5 на стр. 37. На стр. 106, 112 и 114 даны ссылки на рис. 11, 12 и 13, а надо ссылаться на рис. 8, 9 и 10, соответственно. На стр. 121 и 123 даны ссылки на рис. 15 и 16, а надо ссылаться на рис. 12 и 13 соответственно. Однако в диссертации всего 21 рисунок, а не 16, как сказано в «Структуре и объёме диссертации».

5. В тексте встречаются ошибки, опечатки и неудачные выражения.

Однако перечисленные выше замечания не снижают общей положительной оценки настоящей работы.

Работа Силуяновой Э. В. – завершённый научно-исследовательский труд, выполненный по чёткому плану на высоком методическом уровне с использованием самых современных методов, на большом экспериментальном материале, в нём отражены все основные аспекты изучаемой проблемы.

Заключение. По актуальности проблемы, глубине её проработки, методическому уровню, научно-практической ценности полученных результатов, завершённости исследований и общему вкладу в теорию и практику диссертационная работа Силуяновой Элины Владимировны на тему **«Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А(Н3N2) и В в период 2003-2013 гг. в РФ»** соответствует паспортам научных специальностей, полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук,
заведующая кафедрой ветеринарной вирусологии
ФГБОУ ВПО МГАВМиБ

Е.И. Ярыгина
06.06.2014.

Подпись Е.И. Ярыгиной удостоверяю
Учёный секретарь учёного совета
ФГБОУ ВПО МГАВМиБ,
кандидат сельскохозяйственных наук

С.С.Маркин

