



L. PASTEUR

Федеральное бюджетное учреждение науки  
**«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ  
ИМ. ПАСТЕРА»**

(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии  
имени Пастера)

Мира ул., д. 14, Санкт-Петербург, 197101  
Телефон (812) 233-20-92, Факс (812) 232-92-17  
E-mail [pasteur@GT2978.spb.edu](mailto:pasteur@GT2978.spb.edu)  
<http://pasteurorg.ru>

ОКПО 01967164, ОГРН 1037828006314  
ИНН/КПП 7813047047/781301001

№ 557 от 12.09.2014 г.

В диссертационный совет при  
ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава РФ

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
Заместитель директора по научной работе  
ФБУН «НИИ эпидемиологии и  
микробиологии имени Пастера»  
член-корреспондент РАН,  
профессор А.А. Тоголян

«  » сентября 2014 г



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы  
ДАНИЛЕНКО ДАРЬИ МИХАЙЛОВНЫ на тему: «Анализ эволюционной изменчивости и  
биологических свойств вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09,  
циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг.», представленной на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02- вирусология.

#### Актуальность темы

До сих пор вирусы гриппа вызывают самые массовые заболевания с различной степенью тяжести, занимая наряду с острыми респираторными вирусными инфекциями ведущее место в структуре общей инфекционной заболеваемости. Несмотря на активную вакцинацию населения во всем мире, ежегодно эпидемии гриппа вовлекают до 15% населения Земли, что связано с постоянным антигенным дрейфом, происходящим с различной интенсивностью у вирусов гриппа, а каждые 10-40 лет возникают пандемии, вызванные появлением вариантов вируса с новыми биологическими свойствами за счет реассортации сегментов генома различных подтипов вируса гриппа А. Последняя пандемия была зарегистрирована в 2009 г., характеризовалась высокой летальностью, связанной со стремительным развитием геморрагических пневмоний, и была обусловлена не новым высокопатогенным вирусом гриппа птиц А(Н5N1), а вирусом гриппа с хорошо известной антигенной формулой А(Н1N1), варианты которого на протяжении последних 100 лет были причиной уже четырех пандемий и последующих эпидемий.

Следует отметить, что новый вариант вируса гриппа А(Н1N1), названный А(Н1N1)pdm09, хотя и получил широкое распространение в течение нескольких лет, в сезон 2011-2012 гг в Российской Федерации его удельный вес в этиологической структуре гриппозной эпидемии был минимален, но уже в последующий год начал активно циркулировать на всей территории РФ. Очевидно, что за это время в процессе эволюционных



изменений данный вариант вируса приобрел дополнительные селективные преимущества перед другими циркулирующими вариантами, что обеспечило ему значимую вирулентность и трансмиссивность.

Поэтому, несомненно, что изучение особенностей произошедших эволюционных изменений в геноме различных штаммов пандемического вируса A(H1N1)pdm09, выделенных на различных территориях РФ на протяжении всего периода циркуляции данного варианта вируса с 2009 по 2013 гг, а также изучение их биологических свойств, в том числе, вирулентности и трансмиссивности, крайне важны не только для глубокого понимания механизмов взаимодействия патогена и хозяина, но и для совершенствования противогриппозных вакцин, а также для разработки эффективных противовирусных препаратов и этиотропной противовирусной терапии.

В связи с этим, диссертационную работу Д.М. Даниленко можно с полной уверенностью считать своевременной и актуальной.

**Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов** не вызывают сомнений. Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных вирусологических (выделение изолятов вируса гриппа на различных клеточных культурах и куриных эмбрионах, определение инфекционной активности изолятов вируса гриппа на клеточных культурах, определение нейраминидазной активности, определение индекса апоптоза), молекулярно-генетических (выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР в режиме реального времени, секвенирование), серологических (РГА, РТГА) методов исследования, а также компьютерных программ (филогенетический анализ, построение антигенных карт, анализ сайтов позитивной селекции, моделирование третичной структуры белков, статистическая обработка). Автором проанализировано 4602 образца назофарингеальных мазков, полученных от пациентов с диагнозом ОРВИ, 309 образцов секционного материала 161 пациента. Из исследованных образцов биоматериала автором было выделено 559 изолятов вируса гриппа A(H1N1)pdm09. В работе использована обширная коллекция эталонных и референс-штаммов вируса гриппа человека, птиц и свиней различных подтипов, а также более 340 изолятов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, изолированных на 49 опорных базах Национального Центра по гриппу на территории России в период с 2009-2013 гг. Все результаты подвергнуты статистической обработке с помощью пакета программ MS Office Excel 2010 и Statistica 6.0.

Положения, выносимые на защиту обоснованы, выводы диссертации корректны и логично вытекают из сформулированных автором задач и результатов проведенных исследований. Автор лично участвовала в планировании и получении результатов на всех этапах рецензируемой работы.

**Научная новизна диссертационной работы** состоит в том, что автор впервые комплексно изучила 968 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших на различных территориях РФ. Впервые изучены особенности выделения данного варианта вируса гриппа на различных клеточных линиях человека и животных в сравнении с куриными эмбрионами. Д.М. Даниленко установила, что штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09, также как и вируса гриппа свиней A(H1N1), обладают пониженной репродуктивной способностью в клеточных линиях человека, сопровождающейся слабой индукцией апоптоза, по сравнению со штаммами высоковирулентного варианта вируса гриппа птиц A(H5N1) и эпидемического варианта вируса гриппа человека A(H3N2), и доказала, что предпочтительной системой для выделения вируса гриппа A(H1N1)pdm09 из секционного материала являются куриные эмбрионы.

Использованные в работе современные методы исследования позволили автору показать, что независимо от территории и периода идентификации все изученные штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 характеризуются антигенной однородностью, и определить аминокислотные позиции 222, 223 и 374 в белке гемагглютинина, наиболее подверженные позитивной селекции в пятилетний период.



### **Практическая значимость исследования**

В рамках сотрудничества по надзору за гриппом со Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) 137 штаммов пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, изолированных на различных территориях РФ в пятилетний период, переданы в две международные референс-лаборатории: CDC&P, Атланта, Джорджия, США и NIMR, Лондон, Великобритания). Три из них (А/Санкт-Петербург/27/2011, А/Санкт-Петербург/100/2011, А/Астрахань/1/2011) выбраны как репрезентативные штаммы, что является актуальным для мониторинга структуры популяции гриппа в различных регионах мира.

Результаты типирования и антигенного анализа 968 штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, показали, что большинство изученных штаммов, выделенных на различных территориях РФ, имели антигенное сходство с эталонным штаммом вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 - А/Калифорния/07/09 кандидатом в вакцинные штаммы, что является важным результатом при оценке необходимости обновления штаммового состава гриппозных диагностикумов и вакцин.

Полученные результаты эффективности выделения различных вариантов вируса гриппа на клеточных культурах и куриных эмбрионах использовались при проведении курсов по повышению квалификации врачей-вирусологов, организованных ВОЗ в 2011 и 2013 гг. на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертация Д.М. Даниленко изложена на 228 страницах машинописного текста и состоит из нескольких разделов. Она включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, главу собственных исследований, состоящую из четырех частей, обсуждение, заключение, выводы, списков литературы, список иллюстративного материала и приложения. Работа проиллюстрирована 29 таблицами и 30 рисунками. В списке литературы приведены 234 источника, из которых 214 на иностранном языке. Следует отметить, что почти половина цитируемых источников опубликована в последние 5 лет.

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы и степень разработанности проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту, а также описан личный вклад автора и соавторов при выполнении текущего исследования.

Обзор литературы содержит подробный анализ научных публикаций по рассматриваемой теме. В нем представлен обзор прошедших пандемий, изложены современные гипотезы о возникновении и вымирании пандемических штаммов. Описаны события пандемии 2009-2010 гг, обусловленной вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09. Отдельное внимание уделено биологическим свойствам нового вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с вирусами гриппа А человека и животных, представлены гипотезы формирования данного варианта вируса. Проанализированы данные об антигенных и молекулярно-биологических свойствах вирусов А(Н1N1) и пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09.

В главе «Материалы и методы» дается подробное описание использованных методов исследования (вирусологические, серологические, молекулярно-генетические), а также компьютерных программ и ресурсов, использованных автором для обработки и анализа полученных результатов.

Результаты собственного исследования представлены в главе 3, состоящей из четырех частей (3.1, 3.2, 3.3 и 3.4). Часть 3.1. посвящена изучению особенностей выделения штаммов вируса пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 из образцов различного биологического материала с использованием клеточных линий человека и животных и куриных эмбрионов. В ходе проведенных исследований диссертант выделил 559 штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 из образцов биологического материала, собранного за пятилетний период активной циркуляции данного варианта вируса гриппа



на российской территории. Использование широкого спектра клеточных линий в сравнении с куриными эмбрионами позволило автору убедительно доказать, что оптимальной системой для выделения и культивирования штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 из образцов секционного материала, так же как и из образцов назофарингеальных мазков служат куриные эмбрионы, а не клеточные линии.

Во второй части 3.2 главы собственных исследований автор проводит изучение биологических свойств пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и вирусов гриппа А птиц, животных и человека. Полученные результаты показали, что штаммы вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавшие в 2009 г., также как и вируса гриппа свиней подтипа A(H1N1) имели пониженный уровень репликации в исследуемых линиях по сравнению со штаммами вируса гриппа человека подтипов A(H1N1), A(H2N2), A(H3N3) и вируса гриппа птиц подтипа A(H5N1). Анализ интенсивности апоптоза, индуцируемого вирусами гриппа человека подтипов A(H1N1)pdm09, A(H1N1), A(H3N2), а также вирусами гриппа птиц A(H5N1) и свиней A(H1N1) в клеточных линиях человека, проведен автором с применением метода световой люминесцентной микроскопии и биохимических маркеров (Аннексин V, Йодид пропидия, ТМРЭ, 7-АДД). Индексы апоптоза, индуцированного штаммами вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 и вируса гриппа свиней A(H1N1), были низкими и не имели достоверных различий по сравнению с таковыми штаммов вируса гриппа человека A(H3N2) и птиц A(H5N1).

Исследование активности нейраминидазы проведено на широком спектре современных штаммов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 в сравнении с референсными штаммами вируса гриппа птиц, животных и человека. Высокая активность нейраминидазы отмечена для штаммов вируса гриппа птиц подтипов A(H5N1), A(H2N2) и вируса человека A(H2N2), в то время как штаммы вируса гриппа свиней A(H1N1) и вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 характеризовались низкой активностью нейраминидазы.

Следующий раздел 3.3 работы содержит результаты анализа антигенных свойств более 900 штаммов вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных за пятилетний период 2009-2013 гг активной циркуляции данного варианта на территории РФ. Получены убедительные данные об антигенной однородности большинства исследованных штаммов и их антигенного родства с вирусом гриппа свиней подтипа A(H1N1).

Заключительная часть 3.4 главы собственных исследований посвящена изучению изменчивости поверхностных белков штаммов вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в разные годы с 2009 по 2013 гг. Филогенетический анализ на основе генов *HA* и *NA* показал значительную генетическую неоднородность штаммов вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших в период с 2009 по 2013 гг на территории РФ. Автор на основе анализа аминокислотных последовательностей белков *HA* и *NA* определил, что хотя многие из выявленных замен, произошедших в ходе циркуляции вируса в человеческой популяции на протяжении пяти лет, локализованы в известных антигенных сайтах, они не привели к изменению антигенных свойств штаммов вируса пандемического гриппа A(H1N1)pdm09. Обращают на себя внимание данные о значимости позитивной селекции мутаций белка *HA* в положении 222 и 223, расположенных вблизи рецептор-связывающего сайта, и в положении 374 в направленной эволюции пандемического вируса A(H1N1)pdm09. Совокупность результатов определения сайтов, находящихся под действием позитивной селекции в белке *NA*, и количества аминокислотных замен в белке *NA* позволила автору сделать вывод о том, что на данном этапе циркуляции вируса A(H1N1)pdm09 давление отбора на *NA* не выражено.

В главе "Обсуждение" автор на высоком профессиональном уровне анализирует полученные результаты и обсуждает их в контексте с имеющимися литературными данными.

Выводы диссертационного исследования Д.М. Даниленко полностью соответствуют поставленным цели и задачам, что свидетельствует о законченности работы.



### **Замечания**

Существенных недостатков в работе не обнаружено. В качестве замечания следует отметить, что в главе «Материалы и методы» приводится описание получения только 559 штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. В тоже время в дальнейшей работе, в теоретической и практической значимости автор указывает, что изучено свыше 900 штаммов данного вируса, выделенных в пятилетний период на различных территориях РФ, нет данных откуда автором получены еще более 340 штаммов. В литературном обзоре не представлены отдельно данные о структуре генома вируса гриппа. В оглавлении название главы 3.1. не совпадает с названием той же главы в тексте. Эти замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

### **Вопрос для обсуждения**

Следует отметить путанность в терминологии «штамма», «изолята», «варианта» или просто «вируса» при обозначении одного и того же «объекта» исследования. Так, в главе «Материалы и методы» при описании подраздела вирусы на стр. 67 автор использует «штаммы» при указании на эталонные и референсные, «изоляты» - эпидемические, «вирусы» гриппа птиц, на стр. 69 автор уже указывает, что выделено 559 вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Далее в следующих разделах подобная терминология не сохраняется. В связи с этим возникает вопрос, какие «объекты» исследования автор относит к штамму, изоляту или вирусу, в чем их различия?

### **Заключение**

Диссертационное исследование ДАНИЛЕНКО ДАРЬИ МИХАЙЛОВНЫ на тему: «Анализ эволюционной изменчивости и биологических свойств вирусов пандемического гриппа А(Н1N1) pdm09, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02- вирусология является законченной научно-классификационной работой. В диссертации содержится решение актуальной научно-практической задачи по изучению генетической, антигенной изменчивости, приобретаемых фенотипических особенностях штаммов вируса пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09, произошедших в пятилетний период активной его циркуляции в человеческой популяции на различных территориях РФ.

По актуальности темы, объему авторских исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация Д.М. Даниленко соответствует профилю 03.02.02 - «вирусология» и отвечает требованиям п. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, ДАНИЛЕНКО ДАРЬЯ МИХАЙЛОВНА, заслуживает искомой степени.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании Проблемной комиссии по вирусологии (протокол № 4/14 от 11.09. 2014 г.).

### **Рецензент:**

Ведущий научный сотрудник  
Лаборатории молекулярной биологии  
ФБУН «Научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии  
имени Пастера», доктор биологических наук



О.В. Калинина

Подпись О.В. Калининой заверяю  
Ученый секретарь  
ФБУН «Научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии  
имени Пастера», кандидат медицинских наук

Г.Ф. Трифонова