

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

*С.Б.Яцышина, А.Н.Миненко,
П.В.Волошина, А.В.Кудрявцева,
М.Н.Прадед, С.И.Браславская,
Г.А.Шипулин, В.В.Малеев,
В.И.Покровский*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ГРИППА А/Н1N1(sw2009), ИЗОЛИРОВАННЫХ В 2009 — 2010 ГГ. В РОССИИ

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

Цель. Оценка генетического разнообразия циркулировавших на территории России вариантов вируса гриппа А/Н1N1(sw2009), изучение патогенности вируса для человека и потенциальной чувствительности к противовирусным препаратам. *Материалы и методы.* Выполнено секвенирование фрагментов ПЦР генома вирусов гриппа, обнаруженных в образцах прижизненного и посмертного материала от 436 пациентов. Получены последовательности 4 полных геномов вирусов гриппа А/Н1N1(sw2009). Проведен филогенетический анализ. *Результаты.* Показана высокая гомология (98,9 — 100%) вирусов по генам гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA) и их аминокислотным последовательностям (1,3 и 1,4% соответственно). Различие остальных белков не превышало 1,1%. Зафиксировано разнообразие вирусов в позиции 222 в области связи НА с рецепторами и единственный полиморфизм в ряде внутренних белков. Известные мутации устойчивости к тамифлю и арбидолу обнаружены не были. Все вирусы резистентны к ремантадину. Маркеры высокой патогенности не обнаружены. *Заключение.* Высокая гомология вирусов гриппа свидетельствует о низком уровне антигенных различий, однако в популяции вирусов имеются варианты с различной степенью приспособленности к организму человека и разным средством к рецепторам верхних и нижних дыхательных путей, что может обуславливать их различную трансмиссивность.

Журн. микробиол., 2011, № 1, С. 26—34

Ключевые слова: вирус пандемического гриппа А/Н1N1(sw2009), филогенетический анализ, тамифлю, ремантадин

*S.B. Yatsyshina, A.N. Minenko,
P.V. Voloshina, A.V. Kudryavtseva,
M.N. Praded, S.I. Braslavskaya,
G.A. Shipulin, V.V. Maleev,
V.I. Pokrovsky*

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUSES A/H1N1(sw2009) ISOLATED IN RUSSIA IN 2009 — 2010

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Aim. Assessment of genetic diversity of influenza virus A/H1N1(sw2009) variants circulated in Russia, study of virus' pathogenicity in humans and potential resistance to antiviral drugs. *Materials and methods.* Sequencing of PCR-fragments of genome of influenza viruses isolated from clinical and autopsy samples of 436 patients. Four full genome sequences of influenza viruses A/H1N1(sw2009) were obtained. Phylogenetic analysis was performed. *Results.* High degree of homology (98.9 — 100%) was found among influenza A/H1N1(sw2009) viruses in HA and NA genes as well as in their aminoacid sequences (1.3 and 1.4% respectively). Differences in other proteins did not exceed 1.1%. Diversity was found in position 222 of receptor-binding locus of HA and single amino acid polymorphism — in several internal proteins. Known mutations determining resistance to Tamiflu and Arbidol were not detected. All viruses were resistant to remantadine. Molecular markers of high pathogenicity were not found. *Conclusion.* High homology of influenza viruses determines low level of antigenic differences although in populations of viruses there are variants with different levels of adaptation to human organism and different affinity to receptors of upper and lower respiratory tract that can determine their different transmissibility.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2011, No. 1, P. 26—34

Key words: pandemic influenza virus A/H1N1(sw2009), phylogenetic analysis, Tamiflu, remantadine

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа А широко распространены в природе и могут легко преодолевать межвидовые барьеры, быстро приспосабливаясь к организму нового хозяина и подвергаться реассортации. Периодически в природе появляются реассортанты эпидемических вирусов человека — H1N2, реассортанты вирусов, эволюционировавших ранее изолированно в популяции разных видов животных: птиц и свиней [14], птиц и людей, людей и свиней. В последние годы были обнаружены тройные реассортанты (triple-reassortant), несущие в геноме сегменты вирусов, принадлежащих к линиям вирусов гриппа птиц, свиней и людей [15]. Вирус гриппа А/H1N1(sw2009), также именуемый А/H1N1v, или А/H1N1sw1 и вызвавший пандемию в 2009 — 2010 гг., появился в результате реассортации вирусов А/H1N1 евроазиатской линии гриппа свиней, произошедшей от вирусов гриппа птиц, и тройного реассортанта вируса гриппа, циркулировавшего среди свиней североамериканской линии [12]. Сегменты NA и М получены вирусами евроазиатской линии гриппа свиней в конце 1970-х годов от вирусов гриппа птиц. Сегменты HA, NP и NS получены вирусами гриппа свиней североамериканской линии от птиц около 1918 г. Сегменты PB2 и PA вошли в состав тройного реассортанта в конце 1990-х годов от вирусов гриппа птиц. Сегмент PB1, находившийся ранее в составе эпидемических вирусов гриппа человека А/H3N2, получен тройным реассортантом в конце 1990-х годов. Высокая гомология изолятов, выделенных в начале пандемии в Мексике, США и ряде других стран, свидетельствует о появлении этого варианта вируса в животном мире в результате одномоментного события, однако вследствие отсутствия планомерного мониторинга гриппа у свиней недостаточно данных, чтобы однозначно определить временные рамки и подробности этого события. За период наблюдения с 1958 по 2009 гг. в разных странах включая США сообщалось о 60 случаях инфицирования вирусами свиного гриппа людей, контактировавших с инфицированными свиньями [11], но заболевание, как правило, протекало в легкой форме и не выходило за рамки локальных вспышек. Высокая скорость развития эпидемического процесса в марте—апреле 2009 г. свидетельствовала о том, что в популяцию людей проник новый антигенный вариант вируса гриппа, преодолевший межвидовой барьер и обла-

дающий высокой контагиозностью. Сведения о патогенности данного вируса для человека предстояло изучить в результате эпидемиологического анализа, молекулярно-генетических и вирусологических исследований и клинических наблюдений.

Проведенные в данной работе молекулярно-генетические исследования позволили оценить уровень генетического разнообразия циркулировавших на территории России вариантов вируса гриппа А/H1N1(sw2009) и получить сведения о патогенности вируса для человека на основе данных анализа его генома, а также о его потенциальной чувствительности к специфическим противовирусным препаратам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярно-генетический анализ вирусов гриппа А/H1N1(sw2009) проводили в Референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей на базе ЦНИИЭ при взаимодействии с ТУ и лабораториями ЦГиЭ 52 субъектов РФ. Из лабораторий ЦГиЭ с целью подтверждения результатов исследования и изучения молекулярно-генетических свойств вирусов гриппа согласно МР «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высокопатогенными штаммами вируса гриппа А (H1N1) у людей» и по распоряжениям Роспотребнадзора № 01/17159-9-32 от 14.11.2009 «О совершенствовании организации лабораторных исследований» и № 01/17862-9-32 от 26.11.2009 «Об оптимизации мониторинговых исследований» направлялся клинический и посмертный материал.

Первичные исследования по обнаружению вирусов гриппа А и идентификации субтипа А/H1N1(sw2009) в клиническом и посмертном материале осуществлялись лабораториями ЦГиЭ субъектов РФ методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией с использованием наборов реагентов «АмплиСенс Influenza virus A/B» и «АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine» (ЦНИИЭ), характеристики которых были изучены и опубликованы ранее [1].

В Референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей на базе ЦНИИЭ проводилось повторное исследование образцов материала методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией с использованием наборов реагентов «АмплиСенс Influenza virus A/B» и «АмплиСенс Influenza

virus A/H1-swine». При подтверждении положительного результата выполнялось секвенирование кДНК вирусов гриппа А, полученных в процессе проведения исследования с целью дополнительной идентификации субтипа гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). Фрагменты ПЦР для секвенирования были получены с использованием субтип-специфичных праймеров и реагентов производства ЦНИИЭ. Исследования подвергались клинический и аутопсийный материал, а также культуры вирусов, полученные в лабораториях ЦГиЭ субъектов РФ.

Для секвенирования протяженных участков всех сегментов вируса гриппа А/H1N1(sw2009) были выбраны праймеры, образующие в процессе амплификации набор перекрывающихся фрагментов ПЦР. ПЦР проводили на приборах «Терцик» (ДНК-технология) с использованием реагентов производства ЦНИИЭ. Секвенирование фрагментов амплификации выполняли методом «cycle sequence» с набором ABI PRISM Big Dye™ v.1.1 (Applied Biosystems, USA) согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполнялось с использованием блока программ «DNASTAR» по алгоритму Clustal. Полученные последовательности нуклеотидов депонированы в базу данных GenBank под номерами GQ184628 — GQ184630, GQ246613 — GQ246617, GQ255897 — GQ255901, HM189309 — HM189429. Филогенетический анализ проводился с помощью программы MEGA 3.1 методом Neighbor Joining по алгоритму Kimura 2-parameter с выполнением Bootstrap Test of Phylogeny (1000 повторов) [6].

За период с 28 апреля 2009 г. по апрель 2010 г. на базе Референс-центра по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей ЦНИИЭ исследован клинический и посмертный материал, поступивший из ЦГиЭ регионов РФ с целью подтверждения наличия в нем РНК вируса гриппа А/H1N1(sw2009) и изучения генома вирусов. Всего за это время был исследован материал от 874 человек, полученный из 52 субъектов РФ, в том числе образцы посмертного материала от 284 человек. Положительные результаты были подтверждены в 96,1% случаев при исследовании образцов клинического материала (мазков из носо-

ротоглотки) и в 93% случаев при исследовании образцов аутопсийного материала.

Секвенирование фрагментов ПЦР гена гемагглютинина и/или нейраминидазы вируса гриппа А/H1N1(sw2009) выполнено для образцов материала от 436 пациентов и двух образцов культуры вирусов гриппа в МДСК.

Выполнено секвенирование 80 полных сегментов РНК, кодирующих гемагглютинин, и 29 полных сегментов, кодирующих нейраминидазу вирусов гриппа, обнаруженных в клиническом материале у пациентов, заболевших с мая по декабрь 2009 г., и в образцах аутопсийного материала от умерших с сентября по декабрь 2009 г.

Получены последовательности двух полных геномов вирусов гриппа А/H1N1(sw2009), обнаруженных в мазках из носо- и ротоглотки у пациента, переболевшего в легкой форме в самом начале пандемии (клинический материал собран 21 мая 2009 г.), и из ткани легких пациента 59 лет, скончавшегося от пневмонии в декабре 2009 г. Кроме того, секвенированы 2 полных генома вирусов гриппа А/H1N1(sw2009), выделенных в культуре МДСК специалистами Центра гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае из прижизненного материала мазков из носо- и ротоглотки от пациента 52 лет, скончавшегося от пневмонии в конце октября 2009 г., и специалистами Центра гигиены и эпидемиологии в Архангельской области из ткани легких пациентки 35 лет, скончавшейся от пневмонии в конце ноября 2009 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты секвенирования амплифицированных фрагментов генов гемагглютинина и нейраминидазы показали их принадлежность к вирусу гриппа А субтипа H1N1 с высокой гомологией (99,3 — 100% по гену гемагглютинина и 99,3 — 100% по гену нейраминидазы) с изолятом А/California/04/2009(H1N1).

С использованием полученных последовательностей РНК вирусов гриппа проведен филогенетический анализ с целью определения филогенетического родства пандемического вируса и оценки уровня генетического разнообразия циркулировавших на территории РФ вариантов вируса гриппа А/H1N1(sw2009). Полученные результаты показали, что исследованные вирусы гриппа А/H1N1(sw2009) имеют высокую гомологию друг с другом и с изолятом А/California/04/2009(H1N1) по наиболее вариабельным генам НА и NA (98,9 — 100%)

и отличаются от вакцинного штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1) на 21 % по гену гемагглютинина. Аминокислотные последовательности изученных вирусов также оказались высоко консервативными: последовательности гемагглютинина и нейраминидазы различались максимум на 1,3 и 1,4% соответственно, по остальным белкам различия не превышали 1,1%.

Вирусы гриппа способны адаптироваться к определенному виду хозяина вследствие мутационного процесса, затрагивающего практически все сегменты генома, в том числе и ген гемагглютинина. К настоящему времени в геноме вирусов гриппа известны несколько участков, определяющих их адаптивные свойства и характеризующие их патогенность для млекопитающих. В исследовании Miotto O.C. et al. [9] с целью идентификации адаптивных мутаций, ассоциированных со способностью вируса передаваться от человека к человеку, было обработано более 40 тысяч белковых последовательностей. В результате были идентифицированы 68 позиций аминокислот, расположенных в последовательности всех восьми «внутренних» белков вируса гриппа А, изучение которых позволяет оценить потенциальную возможность вирусов гриппа передаваться от человека к человеку. В последовательности белков PA и PB2 выделяют по 17 положений аминокислот, определяющих видовую приспособленность, в белке PB1 выделяют одну позицию, 13 в белке NP, 6 в белке NS1, 3 в белке NS2, 10 позиций в белке M2 и 3 в белке M1. В процессе анализа указанных участков генома вирусов самое большое количество положений аминокислот, определяющих видовую приспособленность, было обнаружено в белках HA и NA — 70 и 30 соответственно. В табл. 1 представлен перечень аминокислот, способствующих адаптации к организму человека вирусов пандемического гриппа A/H1N1(sw2009).

В табл. 2 представлены результаты сравнения 4 полных геномов вирусов пандемического гриппа A/H1N1(sw2009), полученных у пациентов с различным исходом заболевания. Сравнимые геномы вирусов показали полную гомологию по белкам M1, M2, NS1 и NS2. Максимальный уровень различий по другим белкам не превышал 1,4%.

С целью обнаружения мутаций, обуславливающих устойчивость вирусов к противогриппозным препаратам, секвенированы участки гена нейраминидазы вирусов грип-

па A/H1N1(sw2009), полученных от 98 человек. Мутации устойчивости к препарату тамифлю (озельтамивир, «Roche») ни в одном из образцов обнаружены не были. Напротив, все изученные вирусы гриппа A/H1N1(sw2009), как и другие представители евроазиатской линии вирусов гриппа свиней, начиная с 1987 г., имели аминокислоту Asp в позиции 31 белка M2, определяющую резистентность к препаратам адамантанового ряда (ремантадин и амантадин). В исследованных 80 последовательностях гемагглютинина вирусов гриппа A/H1N1(sw2009) известных мутаций резистентности к арбидолу обнаружено не было, однако следует отметить, что в настоящее время известно лишь о мутациях резистентности у вирусов гриппа субтипа H7N7, который имеет отличную от H1 структуру молекулы гемагглютинина, и для однозначного ответа на этот вопрос необходимы аналогичные исследования для субтипа H1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, гемагглютинин, являясь основным поверхностным протеином вируса гриппа, функционирует в качестве видоспецифичного лиганда сиаловых рецепторов, расположенных на поверхности клеток организма хозяина, и играет ключевую роль на этапе инфицирования. Показано, что вирусы эпидемического гриппа человека субтипов H1N1 и H3N2 реплицируются преимущественно в секреторных клетках респираторного тракта, которые несут рецепторы Neu5Ac(2-6)Gal, в то время как вирусы гриппа, выделенные из организма птиц, обладают сродством к рецепторам Neu5Ac(2-3)Gal, распространенным преимущественно в кишечнике птиц. В молекуле гемагглютинина имеется ряд аминокислот (138, 159, 190, 225 — 228, нумерация указана по последовательности субтипа H3), расположенных в области связывания с рецепторами, которые высоко консервативны в изолятах от птиц и, в то же время, отличаются от аминокислот в тех же положениях у изолятов тех же субтипов, выделенных от млекопитающих. При этом у изолятов, выделенных от млекопитающих, при их культивировании на куриных эмбрионах появляются аминокислоты, адаптированные к рецепторам птиц. Исследование данных областей гемагглютинина показало, что у всех российских изолятов вирусов пандемического гриппа A/H1N1(sw2009) в трех позициях (159, 190, 227) представлены аминокислоты, характерные для вирусов гриппа свиней, способные

Таблица 1. Анализ видовой приспособленности вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) по аминокислотным последовательностям генома

Белок	Позиция аминокислоты	Вирусы гриппа А/Н1N1(sw2009)/аминокислота	Видовая специфичность/аминокислота	
			Птицы	Человек
PA	356	<i>R</i>	K	R
	382	<i>D</i>	E	D
	400	<i>L/P</i>	Q/T/S	L
	40	<i>N</i>	S	N
	421	<i>S/I</i>	S	I/V
PB1	336	<i>I</i>	V	I
PB2	271	<i>A</i>	T/I	A
	588	<i>I/T</i>	A/V	I
HA1	2	<i>K</i>	E	K
	9	<i>L</i>	F	L
	22	<i>I</i>	V	I
	78	<i>I</i>	L	I
	85	<i>E</i>	D	E
	97	<i>V</i>	I	V/A
	130	<i>R</i>	K	R
	172	<i>G</i>	T/N/D	G
	218	<i>V</i>	G	V/L
	257	<i>I</i>	V/N/T	L/I
	NP	33	<i>I</i>	V
100		<i>V/I</i>	R	V/I
136		<i>I</i>	L	M/I
305		<i>K</i>	R	K
357		<i>K</i>	Q	K/R
NA1	142	<i>A</i>	T	A
	270	<i>T</i>	A/S	T
	272	<i>T</i>	E	T
M2	14	<i>E</i>	G	E
	55	<i>F</i>	L	F
NS1	60	<i>V</i>	A/E	V
NS2	70	<i>G</i>	S	G

Аминокислоты, локализованные в сайте связывания с сиаловыми рецепторами (нумерация по последовательности H3)

Позиция а.к.	Грипп А/Н1N1(sw2009), выздоровление (N=45) Аминокислота, %	Грипп А/Н1N1(sw2009), летальный исход (N=36) Аминокислота, %	Специфичность связи с рецепторами/аминокислота	
			α2-3 (Птицы)	α2-6 (Человек)
138	<i>A</i>	<i>A</i>	A	S
159	<i>S</i>	<i>S</i>	T	G/S
190	<i>D</i>	<i>D</i>	E	D
225	<i>D-71%, E-27%, G-2%</i>	<i>D-42%, E-3%, G-19%, N-8%, D/G-17%, D/N/G-11%</i>	G/N	E/D
226	<i>Q</i>	<i>Q</i>	Q	L/R
227	<i>E</i>	<i>E</i>	A	E
228	<i>G</i>	<i>G</i>	G	S

Примечание. Курсивом и жирным шрифтом выделены аминокислоты, характерные для вирусов гриппа человека. Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены аминокислоты, связывающиеся с рецепторами Neu5Ac(2-3)Gal, характерными для вирусов гриппа птиц.

также связываться с сиаловыми рецепторами верхних отделов респираторного тракта человека, имеющих рецепторы Neu5Ac(2-6)Gal. В ключевых положениях (226 и 228) представлены аминокислоты, имеющие высокое сродство к рецепторам птиц (Neu5Ac(2-3)Gal) и низкое сродство к рецепторам верхнего респираторного тракта человека. Вместе с тем, в позиции 222 (по-

зиция 225 по нумерации последовательности субтипа H3) среди изолятов вирусов гриппа А/Н1N1(sw2009) встречаются несколько вариантов аминокислот: D — характерная для вирусов гриппа свиней, N и G — характерные для вирусов гриппа свиней и птиц, и E — характерная для вирусов гриппа человека. В данном исследовании вирусы, имеющие аминокислоту 222D,

обнаружены у 71% пациентов, заболевание которых закончилось выздоровлением, и у 42% пациентов с летальным исходом заболевания. Вирусы, имеющие аминокислоту 222E, преимущественно встречались у выздоровевших пациентов (27%) по сравнению с группой пациентов с летальным исходом (3%). В ряде изолятов вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в данном положении белка представлена аминокислота 222G, значимость которой обсуждается в последнее время международным сообществом. Данная аминокислота характерна для вирусов гриппа свиней и птиц и не характерна для вирусов гриппа человека, однако при изучении инфекции, вызванной у людей вирусом гриппа птиц A/H5N1, методом иммуногистохимии [16] было продемонстрировано наличие рецепторов «птичьего» типа в бронхах, бронхиолах и легких человека. В данном исследовании вирусы, имеющие аминокислоту 222G, обнаружены у 2% из 45 исследованных пациентов с заболеванием легкой или средней тяжести и в 19% из 36 исследованных образцов секционного материала (ткани легких) у пациентов с летальным исходом заболевания. У

28% пациентов, заболевание которых закончилось летальным исходом, обнаружались вирусы, у которых в этом положении гена HA наблюдался мутационный процесс с изменением кодона, что приводит к экспрессии нескольких вариантов аминокислот одновременно — D/G/N или D/N/G. Полученные результаты свидетельствуют о том, что вирус пандемического гриппа A/H1N1(sw2009) способен эффективно связываться как с рецепторами верхних, так и нижних дыхательных путей человека. По-видимому, при развитии инфекционного процесса в нижних дыхательных путях происходит селективный отбор вариантов вируса, имеющих более высокое сродство к рецепторам, локализованным в этих отделах. Поэтому в 19% образцов вируса гриппа, полученных из аутопсийного материала, обнаруживается аминокислота 222G и в 8% — аминокислота 222N, повышающие сродство вируса к рецепторам Neu5Ac(2-3)Gal, и в 28% образцов аутопсийного материала регистрируется наличие смешанной популяции вирусов — D/G/N и D/N/G. В то же время, в случаях средней тяжести заболевания наблюдалась адаптация и селективный

Таблица 2. Сравнение аминокислотных последовательностей генов изученных изолятов вирусов гриппа A/H1N1(sw2009), вызвавших различный исход заболевания

Белок	Позиция а.к.	Видовая специфичность/ аминокислота		A/California/04/2009	A/Moscow/01/2009 (выздоровление)	A/CRIE-GNY/2009 (летальный исход)	A/Chita/CRIE-8/2009 (летальный исход)	A/CRIE-BVV/2009 (летальный исход)
		Птицы	Человек					
PA	35			F	F	L	F	F
PA	70			A	A	A	V	A
PA	193			Q	Q	Q	R	Q
PA	208			T	T	T	A	T
PA	224			P	S	S	S	S
PA	349			E	E	E	G	E
PA	400	Q/T/S	L	P	P	L	P	P
PA	421	S	I/V	S	S	I	S	S
PB1	618			D	D	D	G	D
PB2	274			A	A	A	A	S
PB2	340			K	K	N	K	N
PB2	588	A/V	I	T	T	T	I	T
HA	100			P	S	S	S	S
HA	145			S	S	S	S	P
HA	214			T	A	A	A	A
HA	220			S	T	T	T	T
HA	225	G/N	E/D	D	D	D	D	D/G
HA	283			I	I	I	V	I
HA	338			I	V	I	V	I
HA	451			T	T	N	T	T
NA	263			I	I	V	I	V
NA	451			D	G	D	D	D
NP	100	R	V/I	V	I	I	I	I
NP	137			M	M	V	M	M
NP	149			Q	Q	H	Q	Q

Примечание. Аминокислотные различия показаны курсивом и жирным шрифтом.

отбор вирусов с аминокислотой 222E (27%), повышающей сродство к рецепторам Neu5Ac(2-6)Gal, локализованным в верхних дыхательных путях. В связи с тем, что для секвенирования использовался за редким исключением клинический или секционный материал, обнаруженные мутации нельзя отнести на счет адаптации вируса в процессе культивирования. В ряде публикаций обсуждался вопрос о наличии ассоциации аминокислоты 222G с более тяжелым течением заболевания. Сообщалось, что данная мутация обнаруживалась в 4—7% образцов вирусов гриппа, выделенных у пациентов с тяжелым течением или летальным исходом по сравнению с 2% вирусов гриппа, обнаруженных в группах легкого течения заболевания [8]. Однако эксперименты на хорьках не доказали причинную связь аминокислоты 222G с более тяжелым течением гриппа [17]. По данным GeneBank такие мутантные изоляты были выделены еще в апреле 2009 г. в США, то есть, нельзя называть эту мутацию новой и заключить на этом основании, что вирус гриппа становится более патогенным для человека.

У всех исследованных изолятов обнаружено 30 аминокислот, расположенных практически во всех белках, за исключением белка M1, и у некоторых изолятов дополнительно обнаружены 4 аминокислоты, способствующие адаптации вируса к организму человека. Тем не менее, в большинстве белков аминокислоты, характеризующие приспособленность к организму птиц, представлены больше, чем аминокислоты, способствующие адаптации вируса к организму человека. Только в белке PB1 выделяют одну позицию, обуславливающую видовую приспособленность, и она характерна для эпидемических вирусов гриппа человека, что объясняется происхождением данного сегмента. Детальный анализ генома вирусов пандемического гриппа A/H1N1(sw2009), обнаруженных на территории России, на наличие известных факторов патогенности показал отсутствие большинства таких маркеров в отличие от высоко патогенного вируса гриппа A/H5N1. Во-первых, в сайте протеолитического расщепления последовательности гемагглютинаина представлена последовательность PSIQSR/GL, которая содержит только одну основную аминокислоту, что свидетельствует о низком индексе патогенности вируса, при этом изоляты отличаются от сезонных H1, для которых характерна последователь-

ность PSIQYR/GL. Во-вторых, во всех исследованных изолятах пандемического вируса гриппа A/H1N1(sw2009) в положении 627 белка PB2 находится аминокислота Glu, ассоциированная с меньшей вирулентностью для млекопитающих. С помощью сайт-направленного мутагенеза в эксперименте *in vivo* было показано, что замена 627 аминокислоты в белке PB2 может изменять эффективность репликации вируса гриппа A/H5N1 в организме мышей. Так, вирус, содержащий Lys в положении 627, вызывал системные инфекции, в частности, реплицировался в мозге мышей, в то время, как вирус, содержащий Glu, реплицировался преимущественно в легких и не приводил к летальному исходу. Известно, что NS1 участвует в регуляции экспрессии белков в инфицированных клетках, с одной стороны, подавляя синтез белков противовирусной защиты, с другой, приводя к дисбалансу цитокинового ответа, что выражается в увеличении выработки провоспалительных и снижении продукции противовоспалительных цитокинов, однако локус гена, обеспечивающий эти функции, до сих пор не идентифицирован. Одной из предполагаемых мутаций, влияющих на вирулентность, считают позицию 92 белка NS1. Так, при инфицировании мышей реассортантом A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), содержащим различные варианты белка NS1 [7], было отмечено, что реассортант с A/Hong Kong/156/97, содержащий Glu в данной позиции, в полтора — два раза сильнее стимулировал выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов (ИЛ1 α , ИЛ1 β , ИЛ6, ИЛ8-подобный хемокин) в легких мышей по сравнению с исходным вирусом H1N1. Напротив, уровень противовоспалительных цитокинов (ИЛ10) в легких мышей при инфицировании таким реассортантом был в два раза ниже, чем при инфицировании исходным вирусом H1N1. Изменение Glu 92 на Asp в белке NS1 с помощью сайт-направленного мутагенеза приводило к снижению титра вируса и снижению смертности инфицированных мышей, при этом в их легких уровень противовоспалительных цитокинов был в 2,5 раза выше, а уровень провоспалительных цитокинов ниже, чем при инфицировании исходным вирусом H1N1. Во всех изолятах пандемического вируса гриппа A/H1N1(sw2009), исследованных в данной работе, в положении 92 белка NS1 находится аминокислота Asp, ассоциированная с меньшей вирулентностью для млекопитаю-

щих. Obenauer J.C. et al. [13] обратили внимание на то, что на карбоксильном конце белка NS1 представлен мотив ESEV-COOH — лиганд, с которым специфически связываются регуляторные белки, содержащие PDZ-домены, играющие ключевую роль в системе сигнальных путей клетки. Замечено, что вирусы гриппа, вызывающие ежегодные эпидемии гриппа у людей, в 92% случаев имеют аминокислоту R, причем мотивы RSKV обладают меньшим сродством к регуляторным белкам, чем мотивы ESEV или GCEV. Вызвавшие высокую смертность изоляты вируса H5N1, выделенные от людей во время вспышек 1997 — 1999 гг. в Гонконге и во время вспышек 2003 — 2004 гг. в Гонконге, Вьетнаме и Таиланде, содержали мотивы, характерные для птичьих изолятов — EPEV и ESEV соответственно. Все исследованные нами изоляты пандемического вируса гриппа A/H1N1(sw2009) содержат преждевременный stop-кодон в последовательности, кодирующей белок NS1, что приводит к потере 11 концевых аминокислот, в том числе, мотива, с которым специфически связываются регуляторные белки, содержащие PDZ-домены. Еще один фактор вирулентности был недавно обнаружен в последовательности белка PB1-F2, кодируемого геном PB1 со сдвигом рамки считывания (+1). Было показано, что наличие аминокислоты Ser в положении 66 белка PB1-F2 ассоциируется с более высокой вирулентностью вируса гриппа птиц A/H5N1 у мышей [4], и обнаружено, что данный белок может вызывать апоптоз. Однако последовательность вирусов пандемического гриппа A/H1N1(sw2009) содержит преждевременный stop-кодон, что приводит к образованию укороченного белка размером 11 аминокислот и характерно для всех вирусов гриппа свиной классической северо-американской линии.

Одним из препаратов для специфической терапии и профилактики гриппа является ремантадин, блокирующий ионные каналы, сформированные встроенным в оболочку вирусов гриппа А тетрамером белка М2. Резистентность вирусов гриппа А к его действию может быть обусловлена появлением одной из мутаций белка М2 в положениях 26 (Leu-26-Phe), 27 (Val-27-Ala или Thr), 30 (Ala-30-Pro), 31 (Ser-31-Asn) или 34 (Gly-34-Glu), которые изменяют конфигурацию ионного канала [2]. Мутация Ser-31-Asn наиболее часто возникает в динамике в процессе лечения людей. В последнее время наблюдалась тенденция увеличения про-

цента резистентных к ремантадину изолятов эпидемических вирусов гриппа. Так, по данным CDC за сезон 2005 — 2006 гг. в США зарегистрирован необычно высокий процент (91%) резистентных к амантадину изолятов вируса гриппа А/Н3N2 [3]. Все изоляты вируса пандемического гриппа А/Н1N1(sw2009), также как и вирусы гриппа свиной евроазиатской линии, с 1990-х годов имеют мутацию Ser-31-Asn, то есть резистентны к ремантадину. ВОЗ для лечения пандемического гриппа рекомендовала применение ингибиторов нейраминидазы: тамифлю (озельтамивир) и релензу (занамивир), блокирующих активный центр этого фермента у вирусов гриппа А и В. Мутации резистентности к озельтамивиру возникают в гене NA типа 1 в положении аминокислот 119 (Glu 119 Val), 274 (His 274 Tyr), 292 (Arg 292 Lys) и 294 (Asn 294 Ser) [10]. В процессе лечения озельтамивиром людей наиболее часто регистрируются случаи возникновения мутаций в положении 274 (His 274 Tyr) [5]. При исследовании участков гена нейраминидазы вирусов гриппа А/Н1N1(sw2009), полученных от 98 человек, мутации устойчивости к препарату тамифлю (озельтамивир) обнаружены не были.

Таким образом, проведенные исследования позволили оценить уровень генетического разнообразия циркулирующих на территории РФ вариантов вируса гриппа А/Н1N1v, оценить их эпидемический потенциал, наличие факторов патогенности и чувствительность к специфическим лекарственным препаратам. Обнаруженные в России с мая 2009 г. по апрель 2010 г. вирусы пандемического гриппа имели высокую гомологию между собой и с зарубежными изолятами, в том числе с California/04/2009. Уровень различий даже по наиболее вариабельным белкам — гемагглютинирующему и нейраминидазе не превышал 1,3 и 1,4% соответственно. У исследованных вирусов гриппа зарегистрирован ряд молекулярных особенностей, которые определяют высокий эпидемический потенциал в отношении человека. Это низкое генетическое, следовательно, и антигенное родство с вакцинными штаммами и циркулировавшими в последние десятилетия эпидемическими вирусами гриппа А/Н1N1, способность связываться с рецепторами эпителия как верхних, так и нижних дыхательных путей человека и наличие ряда аминокислот во внутренних белках, определяющих адаптивные свойства вируса к организму человека. Именно поэтому в отличие от боль-

шинства случаев заражения людей гриппом свиного происхождения, когда вирус не передавался от человека к человеку, новый вариант А/Н1N1(sw2009) обладает высокой трансмиссивностью в популяции людей, его репродуктивный коэффициент 1,2 — 1,6 выше, чем у сезонного гриппа (1,3), но ниже границы, рассчитанной для пандемического вируса 1918 г. (репродуктивный коэффициент 2 — 5) [11]. Обнаружена некоторая вариабельность среди российских изолятов вируса по участкам генома, определяющим приспособленность к организму человека, что свидетельствует о генетической неоднородности циркулирующих вирусов, вероятно, влияющей на трансмиссивность. Тем не менее, вирулентность данных вариантов невысока ввиду отсутствия известных факторов патогенности для млекопитающих, имевшихся у вируса гриппа А/Н5N1, вызвавшего эпизоотию у птиц в 2005 — 2007 гг. и обладавшего летальностью 60% от лабораторно-подтвержденных случаев заболевания человека. По данным ВОЗ в госпитализации нуждаются 5 — 10% пациентов с лабораторно-подтвержденным диагнозом гриппа А/Н1N1(sw2009), летальность в среднем находится на уровне 1%. На основании анализа молекулярных маркеров резистентности вирусов гриппа к противогриппозным лекарственным препаратам можно сделать вывод о том, что циркулировавшие на территории России в 2009 — 2010 гг. варианты вируса гриппа А/Н1N1 (sw2009) в подавляющем большинстве чувствительны к тамифлю, но устойчивы к ремантадину и не имеют известных мутаций резистентности к арбидолу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яцышина С.Б., Миненко А.Н., Прадед М.Н. и др. Диагностика гриппа: новый вариант Н1N1 в России. Эпидемиол. инфекц. бол. 2009, 6: 56-62.
2. Abed Y., Goyette N., Boivin G. et al. Generation and characterization of recombinant influenza A (H5N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. Antimicrob. Agen. Chemother. 2005, 49 (2): 556-559.
3. Bright R.A., Medina M.J., Xu X. et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. Lancet. 2005, 366: 1175-81.
4. Conenello G., Zamarin D., Perrone L.A. A

- dingle mutation in the PB1-F2 of H5N1(HK/97) and 1918 influenza A virus contributes to increased virulence. PloS Pathog. 2007, 3: e141.
5. de Jong M.D., Thanh T.T., Khanh T.H. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. Engl. J. Med. 2005, 353 (25): 2667-2672.
 6. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinformatics. 2004, 5: 150-163.
 7. Lipatov A.S., Andreansky S., Webby R.J. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell response. J. Gen Virol. 2005, 86: 1121-1130.
 8. Miller R.S., MacLean A.R., Gunson R.N. Occurrence of haemagglutinin mutation D222G in pandemic influenza A(H1N1) infected patients in the West of Scotland, United Kingdom, 2009 — 2010. Euro Surveill. 2010, 15 (16): 19546.
 9. Miotto O., Heiny A.T., Albrecht R. Complete-proteome mapping of human Influenza A adaptive mutations: implications for human transmissibility of zoonotic strains. PloS One. 2010, 5 (2): e9025, p. 1-13. (www.plosone.org).
 10. Moscona A. Oseltamivir resistance — disabling our influenza defenses. Engl. J. Med. 2005, 353 (25): 2633-2636.
 11. Mossad S. The resurgence of swine-origin influenza A (H1N1). Cleveland Clin. J. Med. 2009, 76: 337-343.
 12. Neumann G., Noda T., Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature. 2009, 459: 931-939.
 13. Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. Science. 2006, 311 (5767): 1576-1580.
 14. Schmidtke M., Zell R., Bauer K. et al. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2 and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. Intervirology. 2006, 49: 286-293.
 15. Shinde V., Bridges C., Uyeki T. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. New Engl. J. Med. 2009, 361: 1-10.
 16. Shinya K., Ebina M., Yamada S. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. Nature. 2006, 440 (7083): 435-436.
 17. WHO Preliminary review of D222G amino acid substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses. Wkly Epidemiol. Rec. 2010, 85 (4): 21-22.

Поступила 12.07.10

Контактная информация: Малеев Виктор Васильевич, д.м.н., проф., 111123, Москва, Новогиреевская, За, ЦНИИЭ, р.т. (495)176-79-40