

На правах рукописи

ДАНИЛЕНКО
Дарья Михайловна

**АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ВИРУСОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ГРИППА А(Н1N1) pdm09,
ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ
В ПЕРИОД С 2009 ПО 2013 ГГ.**

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ - 2014

Работа выполнена в лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа
Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-
исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Научный руководитель:

Еропкин Михаил Юрьевич, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Зверев Виталий Васильевич, директор Федерального государственного
бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И. И. Мечникова» РАМН, доктор биологических наук, профессор, академик
РАН

Дешева Юлия Андреевна, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им.
академика А. А. Смородинцева «Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения РАМН, доктор
медицинских наук

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский
институт гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.
15/17), тел. (812) 499 15 04; e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Научно-
исследовательский институт гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург,
ул. Проф. Попова, д. 15/17); <http://www.influenza.spb.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2014 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 001.043.01,
кандидат медицинских наук

Суховецкая Вера Федотовна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Грипп – это тяжелая вирусная инфекция, занимающая наряду с другими острыми респираторными вирусными инфекциями первое место в мире в структуре всех инфекционных заболеваний человека. Заболевания гриппом протекают с различной степенью тяжести и могут сопровождаться смертностью, особенно часто регистрируемой для маленьких детей и лиц пожилого возраста. Известно, что эпидемии гриппа возникают ежегодно и охватывают до 15% населения Земли, в то время как пандемии гриппа являются более редким событием, возникающим раз в 10-40 лет. В 2009 была зарегистрирована первая в 21 веке пандемия гриппа. Подготовка к пандемии активно велась под эгидой Всемирной Организации Здравоохранения на протяжении последних 10 лет, однако в отличие от ожидаемого и предсказанного многими экспертами высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А(Н5N1) возбудителем этой пандемии оказался вирус с известной антигенной формулой А(Н1N1).

Уникальность нового возбудителя состояла в сложной комбинации сегментов генома, имеющих происхождение от разных линий вирусов гриппа свиней и птиц, в то время как от вирусов гриппа человека сохранился лишь один из полимеразных генов. Возникновение «тройных реассортантов» вирусов гриппа было отмечено в популяциях свиней в США еще в 1998 году, и спорадическое инфицирование людей такими штаммами отмечалось, однако устойчивой передачи таких вирусов не регистрировалось, в связи с чем эти вирусы не учитывались, как возможные агенты будущей пандемии.

Стремительное распространение пандемического вируса еще раз доказало, что предсказать место и время появления нового вирусного агента пока не представляется возможным, в то же время быстрое обнаружение и установление антигенной формулы возбудителя и его реассортантной природы позволило в кратчайшие сроки создать вакцинные штаммы и получить моновалентные пандемические вакцины для иммунизации населения. По мнению международных экспертов, именно вакцинация, наряду с эффективными мерами этиотропной противовирусной терапии и разработанными планами пандемической готовности, привели к тому, что последствия данной пандемии гриппа расценивали как «мягкое» течение пандемии.

В России новый возбудитель был впервые зарегистрирован в мае 2009 г, однако доминирование вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 пришлось на осенний сезон. Несмотря на широкое распространение вирусов пандемического гриппа в последние пять лет стоит отметить, что в сезон 2011-2012 гг. их удельный вес в этиологической структуре гриппозной эпидемии был минимален, но уже в следующем сезоне они вновь активно циркулировали на территории РФ.

Анализ антигенной изменчивости нового возбудителя представляет собой важнейшую задачу, т.к. именно он позволяет отслеживать антигенный дрейф вирусов и вовремя вносить изменения в состав противогриппозных вакцин. Помимо антигенных свойств не менее важным является анализ генетической изменчивости возбудителя, с тем, чтобы определить, какие варианты наиболее успешно распространяются по миру и установить возможную направленность изменчивости возбудителя.

Появление пандемических штаммов также ставит вопросы об их биологических свойствах как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Сравнение свойств новых штаммов с уже охарактеризованными референс-вирусами прошлых лет позволяет делать прогнозы относительно возможной вирулентности и трансмиссивности этих возбудителей, а также о патогенезе инфекции, вызываемой такими вирусами.

В этой связи изучение антигенных и биологических свойств вирусов A(H1N1)pdm09, циркулирующих в России, и их сравнение с другими изолятами, выделенными в мире, является актуальным и имеет не только теоретический интерес, но и важно с практической точки зрения.

Степень разработанности проблемы.

Вопросы надзора за пандемическим гриппом A(H1N1)pdm09, эволюционной изменчивости и генетического разнообразия этого возбудителя широко освещаются в работах отечественных и зарубежных авторов: О.И. Киселева, Д.К. Львова, А.А. Сомининой, Е.И. Бурцевой, М.Ю. Еропкина, М.П. Грудина, Е.А. Смородинцевой, Y. Kawaoka, R. Fouchier, A.M.E. Osterhaus, A.I. Klimov, N. Cox, P. Palese, R. Webster, J. McCauley, M. Matrosovich, J. Van-Tam, H.-D. Klenk, R. Donis, J. Belser, A.H. Reid, J.K. Taubenberger, M. Worobei, D. Smith, C.A. Russell, C. Brown, C. Scholtissek и многих других.

Их работы содержат фундаментальные основы понимания механизмов формирования и возникновения современных пандемических и потенциально пандемических штаммов, а также анализ событий, приведших к развитию первой в 21 веке пандемии гриппа. В этих работах рассмотрены основные свойства нового пандемического штамма, возможные факторы патогенности возбудителя, проведен детальный генетический анализ, позволяющий сопоставить штаммы A(H1N1)pdm09 с ранее циркулировавшими пандемическими и эпидемическими штаммами гриппа человека, а также вирусами гриппа птиц, свиней и других животных.

Труды отечественных авторов в значительной мере способствовали изучению особенностей распространения нового возбудителя по территории нашей страны, содержат подробный эпидемиологический анализ событий, как отдельных сезонов, так и общий анализ распространения и циркуляции пандемического штамма на территории России. В этих работах отражены также особенности клинического течения гриппа, вызванного новым возбудителем, описаны генетические мутации,

связанные с тяжелыми случаями течения гриппа, отдельные исследования посвящены течению гриппа у беременных женщин и других лиц, относящихся к группам риска.

Однако в значительной части эти исследования охватывают только отдельные аспекты пандемии (например, только эпидемиологические или только вирусологические, или только отдельные сезоны). В этой связи стоит вопрос о проведении исследований, объединяющих данные пятилетних наблюдений за циркуляцией A(H1N1)pdm09 в России, с объединением данных надзора за гриппом и его генетической изменчивостью, а также анализом дальнейшей эволюции возбудителя.

Цель исследования: охарактеризовать антигенные, биологические и молекулярно-биологические свойства вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, циркулировавших в России в период с 2009 по 2013 гг. и выявить направления изменчивости данного возбудителя.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности выделения нового возбудителя A(H1N1)pdm09 в эпидемические по гриппу сезоны в России в период с 2009 по 2013 гг.
2. Оценить интенсивность репродукции вирусов A(H1N1)pdm09 в разных клеточных линиях и их способность к индукции апоптоза, в сравнении с эпидемическими вирусами гриппа человека, вирусами гриппа птиц и свиней.
3. Охарактеризовать антигенные свойства вирусов A(H1N1)pdm09, выявить эволюционные связи с эталонными штаммами, циркулировавшими в мире в разные годы и провести антигенное картирование российских изолятов 2009-2013 гг. выделения.
4. Выявить основные аминокислотные позиции в молекулах поверхностных белков HA и NA, которые повлияли на антигенные и биологические свойства современных российских изолятов A(H1N1)pdm09 с помощью серологических, биохимических и молекулярно-генетических методов.
5. Оценить аминокислотные позиции в молекулах HA и NA, находящиеся под действием позитивной селекции и проанализировать их роль в дальнейшей эволюции возбудителя.

Научная новизна работы. Впервые проанализировано свыше 900 штаммов вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, изолированных на базе ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и в 49 опорных базах Национального Центра по гриппу на территории России в период с 2009 по 2013 гг. Изучены особенности выделения данного возбудителя на клеточных культурах и куриных эмбрионах, описаны особенности выделения вирусов данного подтипа из секционных материалов.

Продемонстрирована антигенная однородность исследованных штаммов на протяжении всего периода исследования.

Впервые проведено исследование биологических свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с широким спектром эпидемических вирусов гриппа человека прошлых лет, а также вирусами гриппа свиней и птиц. Установлено, что вирусы пандемического гриппа, так же, как и вирусы гриппа свиней, демонстрируют пониженную репродукцию на клеточных культурах человека в сравнении с другими вирусами гриппа. При этом способность данных вирусов индуцировать апоптоз в исследуемых клеточных линиях сравнима с таковой для вирусов гриппа свиней и штаммов эпидемического гриппа подтипа А(Н1N1). Установлено, что нейраминидазная активность вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 сравнима с таковой для эпидемических вирусов гриппа А(Н1N1) и вирусов гриппа свиней независимо от системы выделения вируса.

Впервые проведен подробный анализ аминокислотного состава молекул HA и NA российских изолятов А(Н1N1)pdm09 2009-2013 гг. выделения. Определены основные аминокислотные позиции, подверженные изменениям в ходе циркуляции вируса за пятилетний период. Проанализированы сайты в молекулах HA и NA, находящиеся под действием позитивной селекции и описана их значимость для дальнейшей эволюции вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.

Теоретическая и практическая значимость работы. В период с 2009 по 2013 гг. проводилась изоляция и идентификация вирусов гриппа, на основании которых была определена этиология эпидемий гриппа в России. В результате проведенных исследований было проведено типирование и антигенный анализ 968 штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Изучение антигенных и молекулярно-биологических свойств этих изолятов позволило установить, что абсолютное большинство вирусов данного подтипа, выделенных в России, были антигенно схожи с эталонным вирусом, кандидатом в вакцинные штаммы А/Калифорния/07/09. Эти данные были важны для оценки необходимости обновления штаммового состава гриппозных диагностикумов и вакцин. Результаты работы использовались при проведении практических занятий по выделению и идентификации вирусов гриппа учебных курсов ВОЗ по повышению квалификации врачей-вирусологов в мае 2011 г. и ноябре 2013г. В рамках сотрудничества с ВОЗ за пятилетний период передано 137 штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в референс-лаборатории (CDC&P, Атланта, Джорджия, США и NIMR, Лондон, Великобритания) с целью международного мониторинга за гриппом, 3 из которых были выбраны в качестве репрезентативных штаммов (А/Санкт-Петербург/27/2011, А/Санкт-Петербург/100/2011, А/Астрахань/1/2011).

Методология и методы исследования.

Методологической основой исследования послужили работы отечественных и западных исследователей в области классической вирусологии, используемой при

надзоре за гриппом, и стандартизованные в рекомендациях Всемирной Организации Здравоохранения, а также современные разработки в области молекулярной биологии и биоинформатики, позволяющие оценить эволюционную изменчивость вирусов гриппа на генетическом уровне и предсказать возможные направления их дальнейшей эволюции с использованием различных подходов моделирования. Методология экспериментов определялась в соответствии с поставленными задачами исследования.

В работе использованы классические вирусологические методы (выделение вирусов гриппа, постановка реакции гемагглютинации, реакции торможения гемагглютинации, получение иммунных антисывороток, работа с клеточными линиями), наряду с современными методами антигенного анализа (антигенное картирование), а также методы молекулярной биологии (выделение РНК, постановка ПЦР, секвенирование) и методы компьютерного анализа (множественное выравнивание последовательностей, филогенетический анализ, компьютерное моделирование, анализ позитивной селекции).

Положения, выносимые на защиту.

1. Для вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 наблюдается тенденция к более предпочтительному размножению в куриных эмбрионах (КЭ), чем на клеточной культуре MDCK; при работе с секционным материалом КЭ являются лучшей системой выделения, как с точки зрения эффективности выделения вирусов, так и с точки зрения скорости получения результата.
2. Вирусы пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, также как и вирусы гриппа свиней, обладают пониженной репродукцией в клеточных линиях человека и вызывают слабую индукцию апоптоза; в то же время вирусы гриппа птиц подтипа A(H5N1) обладают широким спектром инфекционной активности в отношении клеточных линий как животного, так и человеческого происхождения и эффективно вызывают апоптоз во всех изученных культурах.
3. Антигенный анализ вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных за пятилетний период, показывает их антигенную однородность.
4. За исследуемый период в России наблюдалась циркуляция всех наиболее распространенных в мире генетических групп и подгрупп вирусов A(H1N1)pdm09. Основные аминокислотные замены в НА произошли вблизи рецептор-связывающего сайта (позиция 222), а также в позициях 83 (антигенный сайт C_b), 203, 321, 499. В NA основные изменения зафиксированы для позиций 106, 248 и 351.
5. Анализ сайтов, находящихся под действием позитивной селекции в НА показал, что давление отбора наиболее выражено для позиций 222 и 223, а также позиции 374. Действие позитивной селекции в отношении NA вирусов гриппа на данном этапе циркуляции вирусов не выражено.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном выполнении всех основных разделов работы. Автором проведено выделение, типирование и антигенный анализ большинства исследованных изолятов. Автором также получены все крысиные антисыворотки, использованные в ходе данного исследования, проведено антигенное картирование изолятов. Автором выполнен основной объем работ по изучению репродукции вирусов гриппа на клеточных линиях человека и животных и индукции апоптоза. Большая часть исследований, посвященных молекулярно-биологическому и филогенетическому анализу последовательностей HA и NA, а также оценки позитивной селекции, также проведены лично автором.

Вклад соавторов заключается в предоставлении клеточных линий и работе, связанной с пересевом и поддержанием исследуемых линий, использованных в ходе настоящего исследования, проведении ПЦР-диагностики в режиме реального времени, секвенировании изолятов, консультаций по проведению филогенетического анализа, оценки активности нейраминидазы и в помощи при проведении микроскопических исследований с использованием люминесцентного микроскопа и выполнении фотографий.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Достоверность данных исследования подтверждается использованием значительной выборки анализируемых штаммов (свыше 900 изолятов), а также применением современных методов статистической обработки данных и использованием методов компьютерного моделирования. Материалы диссертации были представлены на II Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 29-31 марта 2010, а также на четырех международных конференциях: Options for the control of influenza VII, HongKong, 3-7 сентября 2010; II-nd International Influenza Meeting, Münster, Germany, 12-14 сентября 2010; III-d International Influenza Meeting, Münster, 2-4 сентября Germany 2012; Options for the control of influenza VIII, Cape Town, South Africa, 5-10 сентября 2013.

Публикации. Результаты диссертации отражены в 15 печатных работах, в том числе в 9 статьях в 3 реферируемых российских журналах и в 2 международных журналах из списка ВАК, а также в тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 228 печатных листах, состоит из: введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, списка иллюстративного материала и приложения. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 30 рисунками. Список литературы содержит 234 источника, в том числе 20 на русском языке и 214 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вирусы. В работе использовались эпидемические и референс-штаммы вирусов гриппа человека подтипов А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09, А(Н2N2), А(Н3N2) из коллекции НИИ гриппа, а также присланные из Международных центров по гриппу ВОЗ (CDC&P, Атланта, США и NIMR, Лондон, Англия); вирусы гриппа свиней и гриппа птиц из коллекции музея вирусов гриппа НИИ гриппа и НИИ проблем биологической безопасности, Казахстан. Все работы со штаммами гриппа птиц и свиней проводились в боксах биобезопасности стандарта BSL-3.

Клеточные линии. В работе использованы перевиваемые клеточные линии почки собаки MDCK и MDCK-Siat1 (CDC, Атланта, США) и карциномы ободочной кишки человека CaCo-2 (ATCC, США; любезно предоставлена для работы проф. А.Ю. Егоровым). Первичная культура клеток почки новорожденного поросенка СП, диплоидная линия ФЛЭЧ, а также перевиваемые клеточные линии человека (А-549, ECV-304, Т-98, А-172, RD, L-41, Girardi Heart) получены из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа.

Сыворотки. При идентификации эпидемических изолятов использовались гипериммунные диагностические сыворотки крупного рогатого скота или овец, ежегодно присылаемые референс-центром ВОЗ (Атланта, США). Хорьковые антисыворотки к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09 предоставлены доктором Дж. МакКоли (СЦ по гриппу ВОЗ, Лондон, Великобритания). Крысиные поликлональные антисыворотки к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09 были получены в НИИ гриппа.

Животные. Для получения диагностических сывороток были использованы белые беспородные крысы весом 300-400 г. (питомником «Рапполово», Россия). Все работы проводились в рамках гуманного обращения с животными согласно стандартным операционным протоколам локальной комиссии по биоэтике НИИ гриппа.

Материалы для выделения вирусов гриппа. Материалы для выделения вирусов гриппа (назофарингеальные мазки и секционные материалы) были получены из больниц и поликлиник г. Санкт-Петербурга, а также из базовых вирусологических лабораторий Федерального Центра по надзору за гриппом (БВЛ).

Культивирование клеток. Культивирование первичных и перевиваемых клеточных линий проводили с использованием питательных сред ДМЕМ и альфа-МЭМ с добавлением 2-5% фетальной сыворотки. Все клеточные линии культивировали без антибиотиков. Питательные среды и сыворотки получали в фирме «БИОЛОТ» (Санкт-Петербург, Россия).

Восстановление, выделение и накопление вирусов гриппа проводили на 10-дневных куриных эмбрионах (КЭ), поставляемых ООО «Племрепродуктор» (пос. Синявино, Ленинградская обл., Россия), культуре клеток MDCK, MDCK-Siat1 и

CaCo-2 согласно методике, рекомендованной ВОЗ (WHO manual on influenza diagnosis and surveillance, 2011).

Идентификацию вирусов гриппа проводили согласно методическим рекомендациям ВОЗ (WHO manual, 2011) и методическим рекомендациям «Выделение вирусов в клеточных культурах и куриных эмбрионах, и их идентификация» (СПб, 2006 г.) с набором диагностических сывороток ВОЗ.

Антигенный анализ проводили в РТГА с использованием панели крысиных антисывороток, полученным к эпидемическим и референс-штаммам вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 разных лет выделения.

Антигенное картирование выполняли по методу, приведенному в работе (Smith D.J. et al., 2004) с использованием программного обеспечения доступного на сайте <http://antigenic-cartography.org/>.

Определение инфекционной активности вирусов гриппа на культуре клеток MDCK проводили по методике, приведенной в руководстве ВОЗ (WHO manual, 2011). Инфекционную активность в данной работе рассчитывали по методу Reed L. и Muench H. и выражали в $\lg T_{50}/мл$.

Определение инфекционной активности вирусов гриппа на монослойных культурах клеток человека в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител проводили в соответствии с методическими рекомендациями (Соминина А.А. и др., 2009).

Определение индекса апоптоза. Апоптоз в клетках определяли по деградации ядерного хроматина, выявляемой при окрашивании красителем Hoechst-33258 (CalBioChem-Behring, Германия). Проводили подсчет нормальных ядер и деградировавших ядер. Индекс апоптоза рассчитывали по следующей формуле: $ИА = (b/c) * 100\%$, где ИА – индекс апоптоза, b – количество апоптотических клеток, c – общее количество клеток.

Окрашивание монослоя клеток красителями: аннексин V, меченный флуоресцеинизотиоцианатом, Hoechst 33342, йодид пропидия, 7-аминоактинимицин D, тетраметилпродаминоый эфир - проводили через 18-22 ч после инфицирования клеток монослоя строго по инструкции производителя (Cayman Chemicals, США) на планшетном ридере VarioScan (ThermoFisher Scientific, Германия) при длинах волн, указанных в инструкции.

Определение активности нейраминидазы проводили согласно методике, приведенной в руководстве ВОЗ (WHO manual, 2011). Учет результатов флуоресценции проводили на планшетном ридере VarioScan (ThermoFisher Scientific, Германия) при длинах волн возбуждения – 360 нм, испускания – 460 нм, соответственно.

Молекулярно-биологический анализ сегментов генома пандемического вируса гриппа А (H1N1)pdm09 проводили согласно протоколу ВОЗ. Использовали

набор для ОТ-ПЦР SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen, США). Секвенирование проводили методом Сэнгера на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100-Avant с использованием коммерчески доступного набора реагентов ABI BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, США).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance с использованием алгоритма CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) и матрицы swgapdnamt, а также с использованием программы MAFFT (Kato, Standley, 2013).

Анализ сайтов позитивной селекции осуществляли с помощью пакета программ HyPhy4.0, доступного для использования на электронном сервере DataMonkey: <http://www.datamonkey.org/dataupload.php>. Модель нуклеотидных замен, использованная при анализе позитивной селекции – НКУ85.

Филогенетический анализ проводили в программе MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Подбор эволюционной модели осуществляли по значению информационного критерия Акаике (AIC) (Akaike, 1974).

Статистическая обработка. Построение графиков и обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Office Excel 2010 и Statistica 6.0, используя U-критерий Манна-Уитни (уровень значимости $p < 0,05$), критерий Вилкоксона, t-критерий Стьюдента, критерий χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Особенности выделения вирусов гриппа А (H1N1)pdm09

С 20 июля 2009 г. по 01 июня 2013 г. нами было получено 4602 мазка из носа из лечебных учреждений Санкт-Петербурга и свыше 600 мазков из носа из БВЛ НИИ гриппа. Всего из проб от больных и умерших в Санкт-Петербурге за период с 2009 по 2013 гг. было выделено 559 вирусов гриппа А(H1N1)pdm09. Общая структура вирусной популяции за изученный период приведена на рисунке 1.

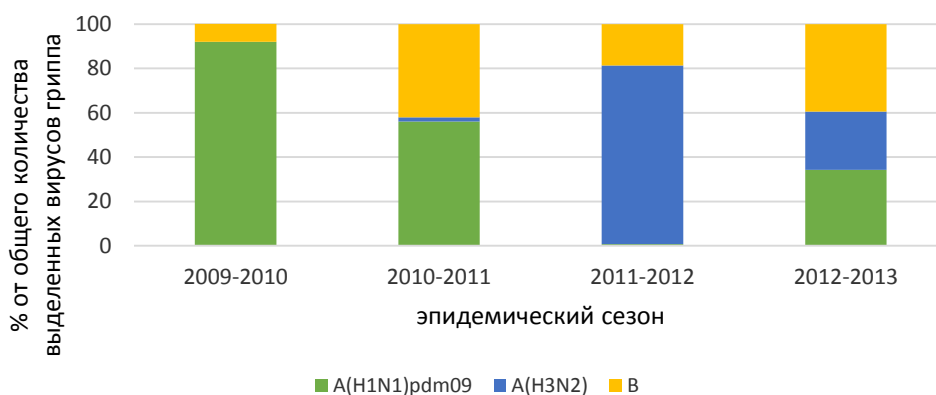


Рисунок 1. Структура популяции вирусов гриппа, выделенных в России за пятилетний период с 2009 по 2013 гг.

Из 559 изолятов, 404 штамма было выделено на куриных эмбрионах и 330 - на культуре MDCK. Сравнительные характеристики по выделению вирусов и их титров при выделении на культуре клеток и в КЭ в различные эпидемические сезоны приведены на рисунке 2. Важно отметить, что выделяемые вирусы, как правило, имели невысокие титры геагглютинации (ГА), а серийные пассажи данных вирусов не всегда приводили к их существенному увеличению. При хранении вирусов в условиях +4°C наблюдалось быстрое и резкое снижение ГА титров за короткий период в 7-10 дней, чего ранее не отмечалось для эпидемических вирусов А(Н1N1) и А(Н3N2) предыдущих годов выделения.

Для выделения вирусов гриппа из секционного материала отбирали фрагменты легких, трахеи, бронхов, и селезенки. По опыту выделения за прошедший период времени отметим, что наиболее эффективное выделение происходило на куриных эмбрионах из фрагментов легких (67%) и трахеи (51% от общего количества выделенных вирусов; статистически достоверное отличие, $p=0,047$), а выделение из селезенки во всех случаях оказалось неэффективным.

Выделение вирусов пандемического гриппа из секционных материалов на культуре клеток было менее результативным и достоверно отличалось от данных, полученных при выделении на КЭ ($p<0,0001$). За указанный период лишь 1 вирус А(Н1N1)pdm09 (из 52) был выделен из секционного материала на культуре MDCK.

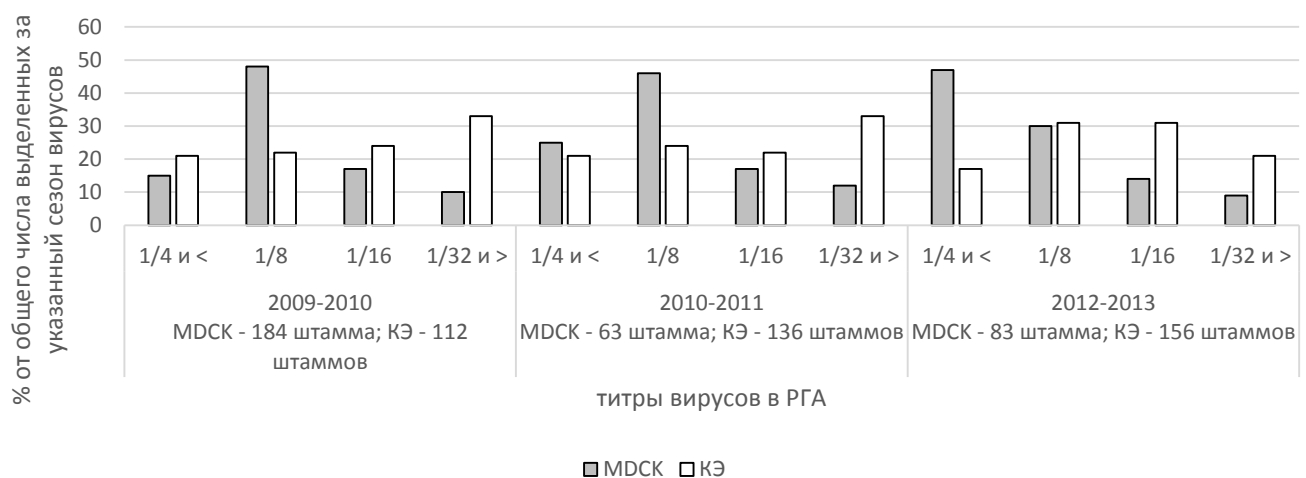


Рисунок 2. Сравнительная характеристика титров ГА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в 2009-2013 гг. на КЭ и культуре клеток MDCK.

Применение генномодифицированной линии MDCK-Siat1 не дало значимых отличий при выделении вирусов гриппа из проб от больных по сравнению с родительской линией MDCK. При попытке выделения вирусов гриппа из постмортальных образцов, положительных в ПЦР на грипп А(Н1N1)pdm09, выделение вирусов гриппа на этой линии оказалось отрицательным во всех случаях. Использование линии CaCo-2 не позволило добиться увеличения эффективности выделения вирусов гриппа из ПЦР-положительных проб от больных и из секционных

материалов. Тем не менее, результаты выделения вируса пандемического гриппа с использованием этой линии были сравнимы с результатами, полученными на клетках MDCK.

2. Биологические свойства вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 в сравнении с эпидемическими вирусами гриппа человека, вирусами гриппа свиней и птиц.

Особенности репродукции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и эпидемических вирусов гриппа человека в сравнении с вирусами гриппа птиц и свиней в клеточных линиях различного происхождения. Установлено, что вирусы гриппа птиц, независимо от степени патогенности, обладали наибольшей инфекционной активностью, как в культурах клеток животных, так и в клеточных линиях человеческого происхождения (табл.1). В то же время эволюционно «новые» вирусы пандемического гриппа демонстрировали пониженный уровень репликации в этих линиях, в то время как современные эпидемические вирусы гриппа и вирусы предшествующих пандемий занимали промежуточное положение. Исключением являлась линия ободочной кишки человека CaCo-2, на которой уровень инфекционной активности вирусов был сравним со значениями, полученными для MDCK. В связи с тем, что репродукция вирусов пандемического гриппа 2009 г. и вирусов гриппа свиней слабо регистрировалась по цитопатическим изменениям во многих протестированных клеточных линиях человека, было дополнительно проведено изучение инфекционной активности исследуемых вирусов в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител к белку NP вируса гриппа типа А. В результате, было установлено, что синтез вирусного белка NP вирусов пандемического гриппа 2009 г. и вирусов гриппа свиней отмечался во всех протестированных линиях, однако, инфекционная активность этих вирусов, рассчитанная с применением ИФА, была ниже по сравнению с вирусами гриппа птиц и вирусами сезонного гриппа A(H3N2), полученными на MDCK, что согласуется с данными литературы (Li I.W.S. et al.,2009).

Штаммоспецифическая индукция апоптоза в монослойных клеточных культурах человека A-549, ECV-304 и ФЛЭЧ. Изучение способности исследуемых вирусов гриппа А индуцировать апоптоз в клеточных линиях человеческого происхождения показало, что апоптоз отмечался во всех исследуемых линиях: А-549, ECV-304 и ФЛЭЧ (рис. 3). Наибольшей чувствительностью к вирус-индуцированному апоптозу обладали клетки карциномы легкого А-549, в то время как диплоидные фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ оказались наименее чувствительной культурой. Во всех трех клеточных линиях интенсивный апоптоз отмечался при инфицировании клеток штаммами гриппа подтипов А(H3N2) и А(H5N1), наиболее низкий индекс апоптоза отмечен для штамма А/Брисбен/59/07 (H1N1). Для подтверждения апоптотической гибели клеток в исследованных

Таблица 1. Чувствительность клеточных линий человека и животных к вирусам гриппа А различного происхождения.

Клеточная Культура/ Вирус гриппа (подтип)	Вирусы гриппа										
	птиц			свиней	человека						
	А/Курица/ Курган/ 5/05	А/Мартын/ Костанай/ 7/07	А/З.Щурка/ Чокпак/ 7а/07	А/Свинья/ 1976/31	А/Кали- форния/ 07/09	А/Санкт- Петербург/ 05/09	А/Пуэрто- Рико/8/34	А/Хаба- ровск/ 74/77	А/Брис- бен/ 59/07	А/Синга- пур/ 1/57	А/Брис- бен/ 10/07
	(H5N1)*	(H5N1)**	(H5N1)**	(H1N1)	(H1N1)pdm	(H1N1)pdm	(H1N1)	(H1N1)	(H1N1)	(H2N2)	(H3N2)
	культуры клеток животного происхождения										
MDCK	7,18±0,12	7,55±0,19	8,3±0,31	5,3±0,28	5,4±0,24	5,7±0,16	5,1±0,33	5,2±0,19	5,9±0,17	4,9±0,28	5,7±0,22
СП	7,1±0,4	6,9±0,16	7,8±0,32	3,8±0,17	2,8±0,19	3,4±0,11	4,4±0,1	4,2±0,12	4,8±0,15	3,2±0,09	5,4±0,2
	культуры клеток человека										
А-549	3,8±0,21	3,5±0,11	3,4±0,18	<1	<1	<1	3,8±0,16	2,1±0,14	2,8±0,11	2,2±0,08	3,2±0,12
ECV-304	6,2±0,28	5,7±0,32	5,8±0,22	2,2±0,08	<1	2,8±0,08	3,4±0,22	3,0±0,16	2,9±0,16	3,2±0,11	4,1±0,15
ФЛЭЧ	4,2±0,13	3,7±0,25	3,2±0,17	<1	<1	<1	3,4±0,12	2,4±0,12	3,2±0,18	<1	2,8±0,18
CaCo-2	7,1±0,22	7,2±0,4	7,1±0,34	4,7±0,11	4,9±0,14	4,3±0,12	4,7±0,16	4,9±0,24	5,1±0,22	4,6±0,14	5,5±0,26
L-41	4,4±0,08	4,0±0,12	5,5±0,27	<1	<1	<1	2,6±0,11	2,0±0,14	2,8±0,08	2,3±0,1	2,6±0,08
RD	4,7±0,12	5,2±0,19	5,8±0,18	1,8±0,1	2,4±0,12	<1	2,8±0,1	2,2±0,12	5,8±0,24	<1	4,7±0,14
T-98	3,4±0,1	4,6±0,08	5,2±0,15	<1	2,2±0,09	<1	2,7±0,09	<1	5,6±0,24	2,5±0,1	3,1±0,12
А-172	2,8±0,09	2,4±0,11	2,4±0,08	2,4±0,09	<1	<1	2,5±0,12	2,1±0,1	2,2±0,1	2,2±0,07	2,4±0,16
Girardi Heart	–	–	–	–	–	–	–	1,6±0,06	1,8±0,08	1,8±0,08	–

* - высокопатогенный штамм гриппа птиц; ** - низкопатогенный штамм гриппа птиц; “–” отсутствие инфекционной активности. Результаты представлены в виде Ig ТЦИД₅₀/мл. Приведены средние значения и стандартные отклонения, полученные для трех независимых опытов.

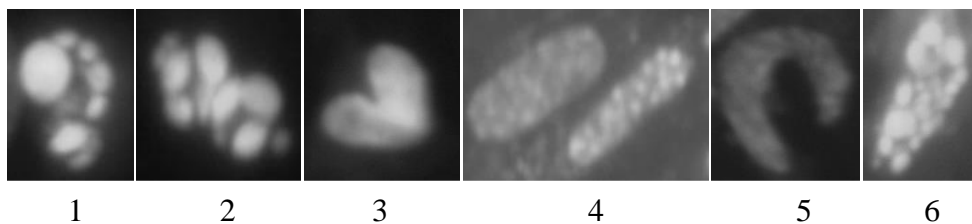


Рисунок 3. Морфологические изменения в ядрах клеток, окрашенных Hoechst-33258 при вирус-индуцированном апоптозе в культурах клеток человека.

1,3 – А-549; 2 – ЕСV-304; 4-6 ФЛЭЧ; 1, 2 – неровность контуров ядра; видны лопасти и формирующиеся отдельные микроядра; 3, 5 – маргинация хроматина; видны ядра в форме «полумесяцев»; 4, 6 – конденсация ядер, выражающийся в их «зернистости»

культурах клеток были использованы биохимические маркеры аннексин V (один из ранних критериев апоптоза) и йодид пропидия (интеркалирующий в ДНК клеток флуоресцирующий краситель, не проникающий через мембрану живых клеток, и используемый для выявления некротических клеток). В инфицированных клетках наблюдалось окрашивание клеток аннексином V и отсутствие окраски йодидом пропидия, что подтверждает данные световой люминесцентной микроскопии об индукции апоптоза вирусами гриппа в изучаемых культурах клеток. Сравнение интенсивности флюоресценции при окраске аннексином V показало, что наиболее интенсивный сигнал обнаруживается в пробах, инфицированных вирусами гриппа А(Н5N1), в то время как для вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 выявляется более слабая интенсивность флуоресценции, что совпадает с данными, полученными в ходе подсчета индекса апоптоза методом световой микроскопии.

Характеристика активности нейраминидазы вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с другими вирусами гриппа птиц, животных и человека. Для сравнительной оценки активности нейраминидазы в тесте MUNANA были выбраны вирусы, содержащие разные антигенные формулы в сочетании с нейраминидазой подтипа N1, а также несколько вирусов с нейраминидазой подтипа N2. Наибольшей активностью обладали вирусы, содержащие нейраминидазу подтипа N2, а также вирусы гриппа птиц А(Н5N1), независимо от степени их патогенности. Вирусы гриппа свиней, выделенные в разные годы, и относящиеся к разным генетическим линиям, обладали вариабельной активностью нейраминидазы. Наибольшая активность - $29,6 \pm 3,04$ мкмоль 4-MU/мл*мин - отмечена для штамма гриппа свиней несущего N1, близкородственную NA подтипа N1 вирусов гриппа птиц, в то время как для вирусов классического гриппа свиней активность нейраминидазы была схожей с эпидемическими вирусами гриппа человека и вирусами гриппа А(Н1N1)pdm09 и различалась в пределах $7,33 \pm 0,28 - 22,87 \pm 1,15$ мкмоль 4-MU/мл*мин. Активность нейраминидазы вирусов А(Н1N1)pdm09 разных лет выделения варьировала, составляя от 9,6 до 35,34 мкмоль 4-MU/мл*мин. В целом, за

исключением отдельных штаммоспецифических отличий можно констатировать, что вирусы гриппа птиц подтипа А(Н5N1), также как и вирусы гриппа птиц и человека А(Н2N2) имели статистически более высокую активность NA в тесте MUNANA, чем вирусы гриппа свиней и вирусы пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09, что хорошо согласуется с данными, полученными другими авторами.

3. Антигенный анализ вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.

Антигенный анализ штаммов, выделенных в ходе выполнения исследования и присланных из БВЛ в 2009-2013 гг., показал, что абсолютное большинство протестированных вирусов были однородны по своим антигенным свойствам и реагировали с диагностической гипериммунной овечьей антисывороткой А(Н1N1)pdm09, полученной из ВОЗ, до 1-1/2 гомологичного титра. Важно отметить, что вирусы, выделенные из секционных материалов, не отличались по антигенным характеристикам от таковых, выделенных из мазков от больных. Лишь несколько выделенных за весь изучаемый период штаммов можно отнести к дрейф-вариантам штамма А/Калифорния/07/09, поскольку они реагировали с соответствующей антисывороткой до 1/8 гомологичного титра.

Известно, что вирусы пандемического гриппа 2009 г. сохранили антигенное родство со «старыми» вирусами гриппа свиней и людей подтипа А(Н1N1), что и было подтверждено генетически. В этой связи представлялось необходимым протестировать выделенные в России штаммы в РТГА с антисыворотками, полученными к вирусам «классического» гриппа свиней, а также вирусу гриппа А(Н1N1) человека А/Нью-Джерси/8/76, вызвавшему вспышку гриппа А(Н1N1) в форте Дикс, в США, также имеющему свиное происхождение. Выделенные штаммы реагировали с антисыворотками к штаммам «классического» гриппа свиней А/свинья/Айова/15/30, А/свинья/США/1976/31 до 1/8 - 1/16, а отдельные даже до 1/4 гомологичного титра. Антисыворотки А/свинья/Гонконг/1/74 и А/Нью-Джерси/8/76 нейтрализовали пандемические изоляты от 1/2 до 1/8 гомологичного титра, что также оказалось неожиданным фактом. Несмотря на то, что с момента вспышки «свиного гриппа» в США в Нью-Джерси прошло свыше 30 лет (а для штаммов гриппа свиней А/свинья/Айова/15/30 и А/свинья/США/1976/31 этот период свыше 70 лет), гемагглютинин этих вирусов и гемагглютинин вирусов пандемического гриппа 2009 г. имеют общие антигенные детерминанты, что подтверждается в РТГА.

В результате проведения углубленного антигенного анализа было установлено, что система выделения не влияет на нейтрализующие свойства сывороток, получаемых к вирусам гриппа: сыворотки, полученные как к MDCK, так и КЭ-вариантам вирусов в большинстве случаев одинаково реагировали в РТГА как с КЭ, так и MDCK-вариантами вирусов.

Для построения антигенных карт были использованы данные РТГА, содержащие 128 антигенов (обозначены ● и ●) и 7 антисывороток (■). Результаты представлены на рисунке 4. Антигенно гомогенные вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 сгруппированы в единое «пятно» вокруг сывороток, полученных к эталонным и референс-штаммам. Большинство из них четко расположено в радиусе 1-1/4 гомологичного титра (2-3 квадрата карты). При этом, штаммы, демонстрировавшие наибольшую антигенную вариабельность расположены дальше на карте, чем основной кластер антигенно схожих вирусов. Таков вирус А/Астрахань/60/09, реагирующий с антисывороткой А/Калифорния/07/09 лишь до 1/8 гомологичного титра, и отстоящий на карте дальше всех остальных антигенов.

Обобщая данные вирусологических исследований можно констатировать, что в эпидемические сезоны 2009-2013 гг. в России, как и в мире, активно циркулировали пандемические вирусы А(Н1N1)pdm09. По своим антигенным свойствам абсолютное большинство российских изолятов были подобны эталонному штамму А/Калифорния/07/2009, а также референс-вирусам А/Южная Каролина/20/2010, А/Гонконг/2121/2010 и А/Крайстчерч/16/10.

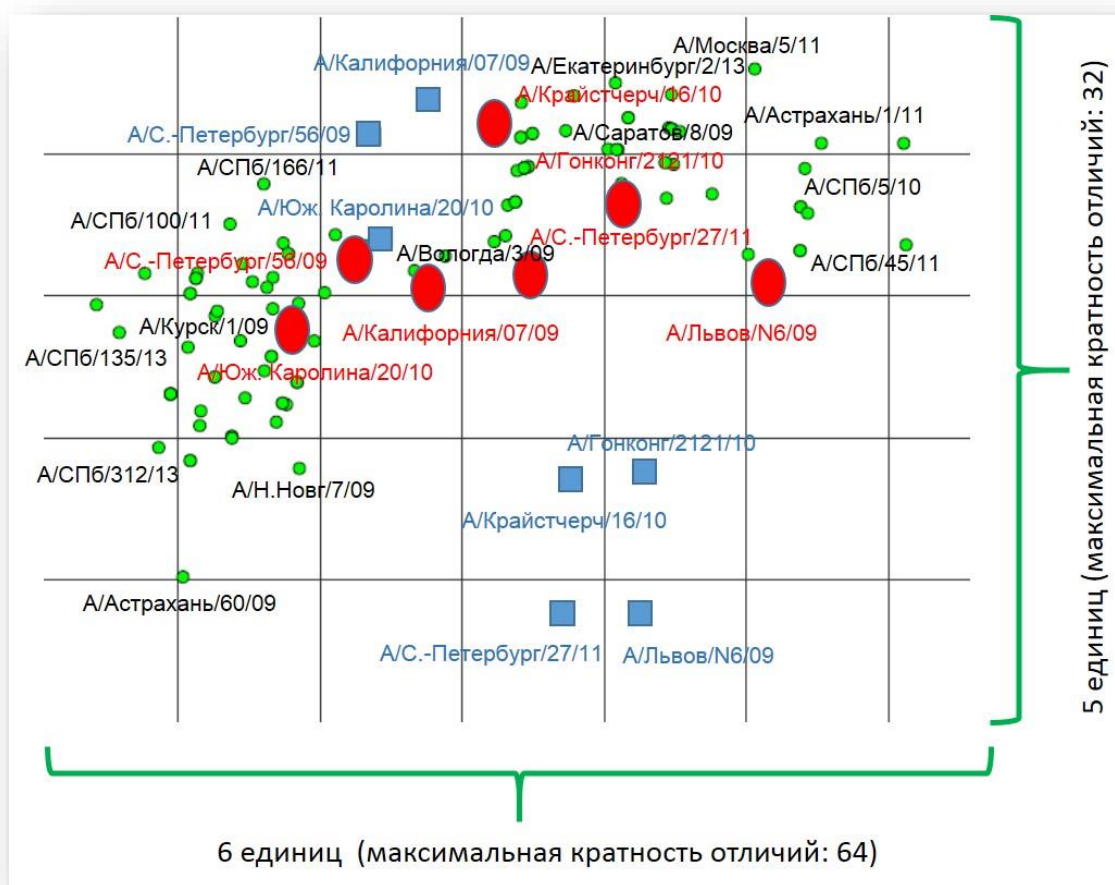


Рисунок 4. Антигенная карта для вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг.

4. Молекулярно-генетический анализ вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 2009-2013 гг. выделения.

Анализ аминокислотного состава НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. В сезон 2009-2010 годов в России, как и в мире, наблюдалась пандемическая фаза циркуляции вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, подобных эталонам А/Калифорния/04/09 и А/Калифорния/07/09. У всех проанализированных российских штаммов этого периода обращают на себя внимание 2 замены: замена пролина на серин в 83 положении и серина на треонин в 203 положении. S203T, по-видимому, является одной из самых первых замен в молекуле НА, зарегистрированных в мире, отличающих эталонные штаммы А/Калифорния/04/09 и А/Калифорния/07/09 от всех остальных изолятов. Эта замена возникла на самых ранних этапах циркуляции вируса в человеческой популяции и обнаруживается практически у всех вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, зарегистрированных до сих пор. Смена пролина в 83 положении на серин была зарегистрирована в мире у вирусов чуть позднее, в период после лета 2009 г., и связана с действием иммунного пресса. Эта мутация локализована в антигенном сайте С_б, расположенном на боковой поверхности молекулы НА1 в удалении от всех остальных антигенных сайтов, локализованных в структуре НА подтипа Н1.

Важными заменами, влияющими на антигенные свойства вирусов, является переменный участок в 154-155 положении, расположенный в антигенном сайте S_б, одном из основных и антигенно наиболее значимых сайтов на верхушке молекулы НА. Здесь отмечены замены K154E и G155E, которые приводят к возникновению вариантов вирусов, антигенно отличных от эталонных штаммов. Таков, например, А/Санкт-Петербург/204/09, для которого наиболее значимые отличия в РТГА были выявлены как при сравнительном использовании сывороток хорьков и крыс, так и при постановке РТГА с сыворотками, полученными к вирусам различных систем выделения. Также появляются вирусы, несущие замены P297S и I321V, которые в дальнейшем получили широкое распространение.

В непосредственной близости от рецептор-связывающего сайта в положениях 222 и 223 уже на самых ранних стадиях циркуляции вирусов А(Н1N1)pdm09 обнаруживалась гетерогенность по составу аминокислот. Для более подробного анализа распространенности мутации в 222 положении был проведен анализ ее встречаемости среди клинических образцов и аутопсийных материалов в базе данных GenBank для вирусов гриппа, секвенированных из образцов, собранных в России, в период с 2009 по 2013 гг. При анализе распространенности мутации в 222 установлено, что в секционном материале мутация D222G встречается в 37% случаев, а в 14% обнаруживается другая замена D222N, также описанная в литературе. При этом ни в одном из случаев не обнаружено замены D222E или каких-либо других вариантов. Таким образом, среди аутопсийного материала вирусы, несущие мутации в 222 положении встречаются в 51% случаев. Поскольку данная мутация

обеспечивает сродство к сиаловым рецепторам, встречающимся в нижних отделах респираторного тракта человека, на примере российских штаммов подтверждается гипотеза о том, что данная замена позволяет вирусам поражать не только верхние дыхательные пути, но и более глубокие отделы респираторного тракта, что приводит к тяжелому течению заболевания, и возможной последующей гибели больного.

Среди штаммов, проанализированных в мазках от больных также встречаются вирусы, несущие мутацию D222G, однако всего в 4% случаев. Интересно, что среди других замен, присутствует как D222N, так и D222E, обнаруживаемая даже чаще, чем D222G. Однако подавляющее большинство вирусов (89%) не несут никаких изменений в 222 положении.

Помимо вариабельности в позиции 222, была также отмечена и замена Q223R, встречающаяся как у штаммов, выделенных из мазков от больных, так и из секционного материала. По-видимому, Q223R напрямую связана с адаптацией вирусов A(H1N1)pdm09 при выделении/размножении на куриных эмбрионах. Отметим, что она встречается примерно с равной частотой среди вирусов, несущих в 222 положении как D, так и замещающие аспартат аминокислоты (G,N) и все вирусы, несущие эту замену были выделены либо восстановлены на куриных эмбрионах.

К началу сезона 2010-2011 гг. генетическое разнообразие вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 увеличивается, как для штаммов, циркулирующих в России, так и во всем мире. Выделяют как минимум две генетические подгруппы: одна из них представлена вирусами типа A/Крайстчерч/16/2010, несущими замены N125D, V94N, V250A, а другая содержит замены S128P, V199A, I295V, K163I, P271S (подгруппа A/Гонконг/2213/2010). Все вирусы несут мутацию S203T. Гонконгская подгруппа не получила распространение в мире, в то время, как в течение трех месяцев к подгруппе вирусов из Крайстчерча добавились еще три генетические группы с характерными аминокислотными заменами, объединенные общей заменой D97N. Вирусы, несущие подобные аминокислотные замены, были зарегистрированы на территории России зимой и весной 2011 г. Еще одной важной аминокислотной заменой, зафиксированной у большинства изолятов в этом сезоне, является E374K. Эта замена была зарегистрирована у единичных штаммов и в предыдущем сезоне, однако к лету 2011 г она стала выявляться у большинства выделенных вирусов. Роль этой мутации установлена: смена глутаминовой кислоты в 374 положении на лизин приводит к стабилизации тримера гемагглютинина, что важно на этапах адсорбции и проникновения вируса в клетку (Yang H. et al., 2014). Несмотря на то, что в сезон 2011-2012 гг. активность вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 была очень низкой, в мире эти вирусы продолжали широко циркулировать, что привело к их еще более выраженной генетической диверсификации. Поэтому к сезону 2012-2013 гг. детектировалось уже как минимум 8 генетических групп вирусов A(H1N1)pdm09, в некоторых из которых были и подгруппы. Стоит особо отметить, что три из

представленных восьми групп, имеют референс-штаммы, выделенные в ходе выполнения настоящего исследования: это группа 5, представленная штаммом А/Астрахань/1/2011, группа 6, имеющая в качестве референс-штамма изолят А/Санкт-Петербург/27/2011, и группа 7, представленная вирусом А/Санкт-Петербург/100/2011. Наибольшее распространение в сезоне 2012-2013 гг. получили вирусы шестой группы, которая разделилась на три подгруппы 6а, 6б, 6с (см. рис 5).

Подводя итог, можно заключить, что генетический анализ молекулы НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в 2009-2013 гг позволил продемонстрировать нарастающую от сезона к сезону генетическую гетерогенность вирусов данного подтипа. При этом, большинство мутаций в НА не были антигенно значимыми, хотя многие из них локализованы в антигенных сайтах С_а, С_б, S_а, S_б и вблизи от рецептор-связывающего сайта.

При анализе сайтов в НА, подверженных действию позитивной селекции, было установлено, что все три использованных метода – SLAC, FEL, IFEL - выделяют позиции 222 и 223, что говорит о том, что эти сайты с очень высокой вероятностью действительно подвергаются позитивной селекции. Роль замены в положении 222 обсуждалась выше, в то время как селекция по положению 223 является искусственной и связана с секвенированием вирусов, изолированных на куриных эмбрионах. Отбор действует и на положение 374 (FEL, IFEL), расположенное в НА2, и обеспечивающее дополнительную стабильность тримеру НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Остальные две позиции – 183 и 191 – были выявлены только методом FEL. Стоит отметить, что вирусы, несущие реверсивную по отношению к А/Калифорния/07/09 замену Р183S были впервые зафиксированы в 2013 г., и только у двух российских изолятов. Замены в положении 191 с лейцина на изолейцин зафиксированы у отдельных штаммов 2009-2011 гг. выделения, однако эти замены никак не влияют на функциональную активность НА, и не находятся в антигенно-значимых областях. Таким образом, анализ сайтов позитивной селекции в молекуле НА позволил подтвердить данные молекулярно-генетического анализа вирусов А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг.

Анализ аминокислотного состава НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Генетическая гетерогенность для второго поверхностного белка вируса гриппа – нейраминидазы – также была зарегистрирована на самых ранних стадиях циркуляции вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в популяции. Уже в сентябре 2009 г. было установлено, что большинство вирусов данного подтипа несут в НА две аминокислотные замены V106I и N248D, которые во всех случаях сочетались с заменой S203T в НА. Эти замены расположены в областях, не связанных напрямую с каталитическими свойствами фермента или же антигенно-значимыми сайтами, однако они присутствовали у всех вирусов, изолированных в сезоны 2009-2011 гг. Необходимо отметить, что помимо этих двух замен все российские изоляты 2009 -

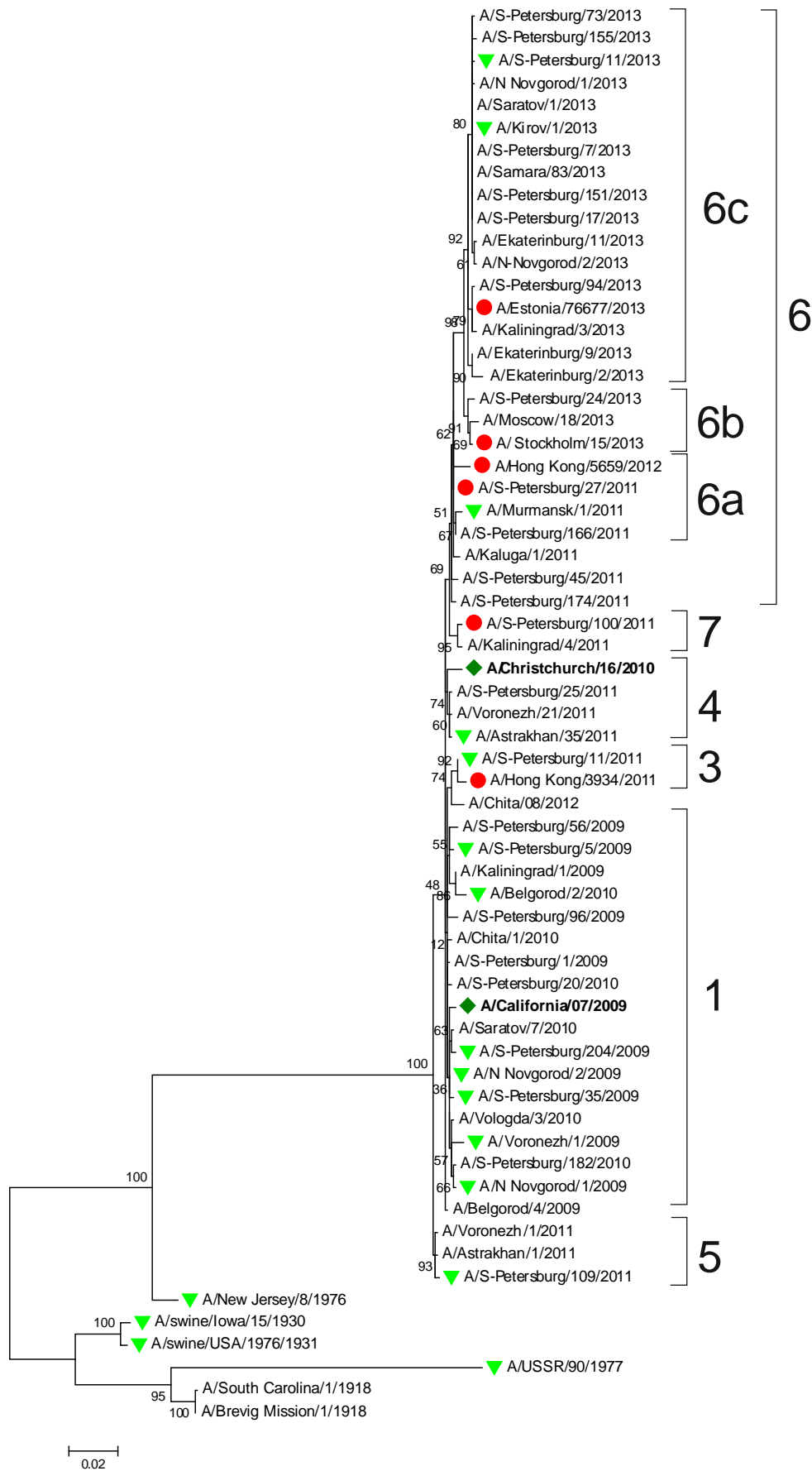


Рисунок 5. Филогенетическое дерево по гену HA, построенное методом максимального правдоподобия. ◆ - кандидаты в вакцинные штаммы; ▼ - вирусы, несущие замену в 222 положении; ● – референс-вирусы генетических групп

2010 гг. приобрели также замену V351F, которая сохраняется и у современных штаммов. Данный аминокислотный остаток расположен в непосредственной близости от активного сайта фермента. Более того, валин в 351 положении NA вирусов пандемического гриппа, скорее всего, является индивидуальной особенностью эталонного штамма А/Калифорния/07/09, т.к. у штамма А/Калифорния/04/09 в этой позиции фенилаланин, также, как и у «старых» вирусов гриппа свиней и вируса А/Нью Джерси/8/1976. Среди других аминокислотных замен, выявленных у штаммов 2009-2010 гг. выделения, присутствуют одиночные штаммоспецифические замены, как например, N386K у штамма А/Санкт-Петербург/20/10, приводящая к утрате потенциального сайта гликозилирования, однако в дальнейшем они не были отмечены у других изолятов.

В следующем эпидемическом сезоне 2010-2011 г. варибельность аминокислотного состава NA возросла. Так, зимой 2011 г отчетливо выделился кластер вирусов, несущих замены V264I, N397K, S442I. А к лету 2011 г. в мире были зарегистрированы еще два дополнительных генетических кластера вирусов пандемического гриппа по NA. Первый отличался характерными заменами N241I и N369K, и ему соответствовали генетические группы 5, 6 и 7 по NA, а для второго были характерны изменения в позициях Q313R и V394I (генетическая группа 3 по NA). С учетом того, что генетические группы 5,6 и 7 по NA широко циркулировали на территории России с 2011 г. неудивительно, что NA этих штаммов в большинстве случаев несла замены N241I и N369K. Аминокислотный остаток 241 находится в глубине молекулы NA, в отдалении от активного сайта фермента, в то время как позиция 369 относится к антигенно-значимой области 367-370. Штамм, принадлежащий к 3-ей генетической группе по NA, А/Санкт-Петербург/11/11 обладал всеми характерными заменами для NA данной группы: Q313R, V394I, R220K и I389K.

Как отмечалось ранее, в сезоне 2011-2012 гг. циркуляция вирусов А(Н1N1)pdm09 была незначительной. Но уже в следующем сезоне 2012-2013 гг. они вновь вернулись в популяцию; и если для NA генетическое разнообразие в этом сезоне достигло своего максимума, то для NA подобного явления не наблюдалось. При этом, почти у всех изолятов этого сезона произошла реверсия в позициях I106V и D248N, таким образом в этих позициях вновь преобладали аминокислоты, характерные для ранних эталонов А(Н1N1)pdm09 А/Калифорния/04/09 и А/Калифорния/07/09. Все проанализированные штаммы содержали замены N241I и N369K, однако они также приобрели дополнительные замены N44S и N200S, которые встречались почти у всех штаммов. Необычным вирусом в отношении аминокислотной последовательности по NA является А/Москва/18/2013, несущий большое количество замен в том числе и в антигенно-значимых областях. Однако, данный вирус не может рассматриваться как типичный для России изолят, поскольку он был выделен от больного, прибывшего из Саудовской Аравии.

В целом, проведенный анализ по гетерогенности аминокислотной последовательности нейраминидазы российских изолятов 2009-2013 гг. позволяет говорить о том, что уровень ее генетической изменчивости ниже такового для гемагглютиниона. На рисунке 6 приведено филогенетическое дерево для гена NA, на котором отмечены генетические группы, соответствующие группам по NA.

При оценке сайтов в NA, находящихся под действием позитивной селекции, было установлено, что давление отбора на NA имеет меньшую интенсивность по сравнению с HA, что выражается в меньшем количестве АК замен, регистрируемых у штаммов различных лет выделения, а также в гораздо меньшем количестве сайтов позитивной селекции, обнаруживаемых с помощью разных методик. Так, при оценке позитивной селекции при уровне значимости $p=0,1$, ни один из методов не выявил ни одного сайта. При $p=0,2$ FEL-анализ выявил аминокислотный остаток 313, изменения в котором характерны для изолятов 3-ей генетической группы (по HA). В случае IFEL обнаруживаются 7 аминокислотных остатков, в каждом из которых были зарегистрированы изменения у штаммов разных лет выделения. Так, изменения в 264 и 397 положениях были характерны для вирусов 2011 гг. выделения, в то время как более поздние изоляты характеризовались полиморфизмом в положениях 369, 44 и 200. Положения 155 и 200 находятся вблизи антигенно-значимых областей и недалеко от активного сайта фермента, так же как и позиция 369. Однако этого нельзя сказать об аминокислотных остатках 44, 264, 397 или 442, роль которых еще предстоит установить.

Заключение. Настоящее исследование посвящено анализу эволюционной изменчивости и биологических свойств вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг. Установлено, что для вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 наблюдалась тенденция к предпочтительному размножению на куриных эмбрионах, особенно ярко выраженная при выделении вирусов гриппа из секционных материалов.

По результатам тестирования ряда биологических свойств вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 было установлено их сходство с вирусами «классического гриппа» свиней подтипа A(H1N1) как в отношении инфекционной активности и индукции апоптоза в культурах клеток человека, так и при оценке нейраминидазной активности исследуемых штаммов.

Проведенные серологический и генетический анализы показали, что антигенное однообразие вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в 2009-2013 гг., сопровождалось выраженной генетической неоднородностью. Особенно ярко это выражалось в отношении HA, и в меньшей степени, для NA. Обнаружение сайтов позитивной селекции свидетельствует о непрерывном давлении отбора на вирусную популяцию, что приводит к постоянным изменениям в поверхностных белках вируса, и способствует отбору штаммов, обладающих

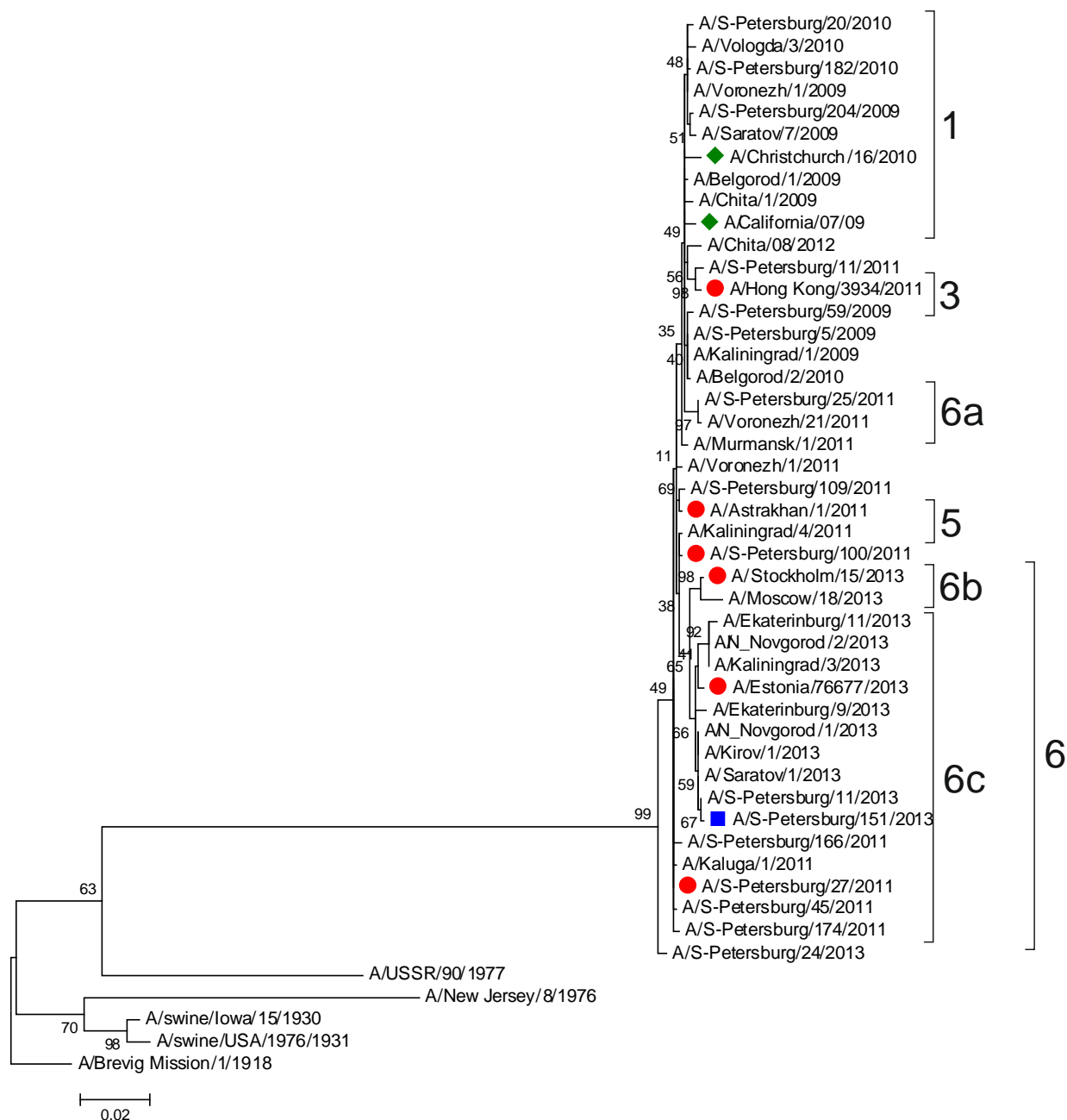


Рисунок 6. Филогенетическое дерево по гену NA, построенное методом максимального правдоподобия. ◆ - кандидаты в вакцинные штаммы; ■ - вирусы, несущие замену в 275 положении; ● – референс-вирусы генетических групп.

селективными преимуществами. В целом, в России за указанный период наблюдалась циркуляция всех наиболее распространенных в мире генетических групп и подгрупп вирусов A(H1N1)pdm09.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что вирусы пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 обладают большей тропностью к размножению в куриных эмбрионах, чем в клеточной культуре MDCK. Куриные эмбрионы являются предпочтительной системой при выделении вирусов пандемического гриппа из секционных материалов, как

с точки зрения эффективности выделения вирусов, так и быстроты получаемых результатов.

2. Доказана антигенная однородность вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных в России в 2009-2013 гг. Антигенное единообразие исследованных штаммов подтверждают данные антигенного картирования.
3. Вирусы пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, также как и вирусы гриппа свиней, обладают пониженной способностью к репродукции в клеточных линиях человека и вызывают в них слабую индукцию апоптоза, в отличие от вирусов гриппа птиц подтипа A(H5N1) и вирусов эпидемического гриппа человека подтипа A(H3N2).
4. За исследуемый период в России зарегистрирована циркуляция всех наиболее распространенных в мире генетических групп и подгрупп вирусов A(H1N1)pdm09. Установлены основные аминокислотные замены в HA, которые произошли как вблизи рецептор-связывающего сайта (позиция 222), и антигенных сайтов С_б (позиция 83) и S_б (154-155), так и вне известных антигенных сайтов (203, 321, 499). На антигенные свойства изолятов влияют замены только в положениях 154-155 молекулы HA. В HA большинство зарегистрированных аминокислотных изменений расположены вне известных антигенных областей и каталитического сайта фермента (позиции 106, 248 и 351).
5. Определено давление отбора на HA в позициях, влияющих на рецептор-связывающие свойства вирусов A(H1N1)pdm09 (222 и 223), а также позиции 374, определяющей стабильность тримера HA. Действие позитивной селекции в отношении HA вирусов гриппа на данном этапе циркуляции вирусов не выражено.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования. В связи с установленным нарастающим генетическим разнообразием поверхностных белков HA и NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и отсутствием значимых антигенных изменений вирусов данного подтипа за прошедший пятилетний период с момента их регистрации в человеческой популяции рекомендуется дальнейший тщательный мониторинг за антигенными свойствами циркулирующих вирусов A(H1N1)pdm09. Быстрое и своевременное обнаружение дрейф-вариантов вирусов пандемического гриппа 2009 г. позволит установить степень их распространенности в популяции, оценить вероятность распространения таких вирусов и позволит предоставить рекомендации для обновления штаммовой композиции, входящей в состав современных диагностикумов и противогриппозных вакцин.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Даниленко Д.М. Первая волна пандемического гриппа 2009 в России: выделение вирусов и антигенный анализ в НИИ гриппа СЗО РАМН / Д.М. Даниленко, Н.И. Коновалова, М.Ю. Еропкин и др. // Материалы II Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. Инфекционные болезни. – 2010. – Т.8, прил.1. – С. 87-88.
2. Ленева И.А. Изучение противовирусной активности отечественных противогриппозных химиопрепаратов в культуре клеток и на модели животных / И.А. Ленева, И.Т. Федякина, М.Ю. Еропкин, Н.В. Гудова, А.А. Романовская, Д.М. Даниленко и др. // **Вопр. Вирусол.** – 2010. – Т. 55, №1. – С. 19-27.
3. Danilenko D.M. Differential cell culture susceptibility to influenza viruses of various origin including pandemic 2009 A(H1N1)v / D.M. Danilenko, A.V. Ivanova, T.D. Smirnova // Options for the control on influenza VII. Hong Kong, China. – 2010. – 3-7 September. – P. 100.
4. Danilenko D.M. Differential cell culture susceptibility to influenza viruses of various origin/ D.M. Danilenko, A.V. Ivanova, T.D. Smirnova // 2nd International Influenza Meeting, Munster, Germany. – 2010. – 12-14 September. – P. 54.
5. Еропкин М.Ю. Пандемический грипп 2009 г. в России: происхождение, антигенные и биологические свойства вируса и чувствительность к противовирусным препаратам / М.Ю. Еропкин, Т.М. Гудкова, Д.М. Даниленко и др. // Русский Мед. Журнал. – 2010. – Т.18, №3. – С. 15-21.
6. Киселев О.И. Пандемический грипп в России. I. Диагностика и молекулярно-биологические характеристики вируса / О.И. Киселев, А.Б. Комиссаров, М.А. Стукова, Ж.В. Бузицкая, М.М. Писарева, Е.А. Елпаева, Д.М. Даниленко и др. // **Вопр. Вирусол.** – 2011. – Т. 56, №1. – С.17-21.
7. Даниленко Д.М. Пандемический грипп в 2009 г в России. II. Особенности выделения и биологические свойства вирусов / Д.М. Даниленко, Н.И. Коновалова, М.Ю. Еропкин и др. // **Вопр. Вирусол.** – 2011. – Т. 56, №2. – С. 4-9.
8. Даниленко Д.М. Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1v, вирусам гриппа птиц, свиней и человека / Д.М. Даниленко, Т.Д. Смирнова, Т.М. Гудкова и др. // **Вопр. Вирусол.** – 2011. – Т. 56, №6. – С. 14-19.
9. Danilenko D.M. Differential cell culture susceptibility and proliferative response to avian, human and swine influenza viruses / D.M. Danilenko, T.D. Smirnova, T.M. Gudkova et al. // **Influenza and other respiratory diseases.** – 2011. – V.5. Suppl. 1. – P. 54-59.
10. Eropkin M.Yu. Isolation, antigenic analysis and biological properties of pandemic influenza viruses A(H1N1)v circulated in Russian Federation in the epidemic season 2009-2010 / M.Yu. Eropkin, D.M. Danilenko, N.I. Konovalova et al. // Turkish J. Clin. Lab. – 2011. – V.2, #1. – P. 27-33.
11. Соминина А.А. Развитие надзора за гриппом в России в системе национального центра ВОЗ / А.А. Соминина, М.П. Грудинин, М.Ю. Еропкин, Е.А. Смородинцева,

М.М. Писарева, А.Б. Комиссаров, Н.И. Коновалова, Д.М. Даниленко и др. // **Вопр. Вирусол.** – 2012. – Т.57, №6. – С. 17-21.

12. Bildanova E.R. Use of CaCo-2 cells for isolation of influenza virus from clinical and post-mortem samples / E.R. Bildanova, D.M. Danilenko, T.D. Smirnova et al. // 3^d International Influenza Meeting, Munster, Germany. – 2012. – 2-4 September. – P. 102.

13. Смирнова Т.Д. Участие цитоскелета клетки в инфекционном цикле вирусов гриппа А / Т.Д. Смирнова, Д.М. Даниленко, А.В. Слита // **Цитология.** – 2013. – Т. 2. – С. 92-100.

14. Даниленко Д.М. Возможности использования поликлональных крысиных антисывороток в антигенном анализе вирусов гриппа человека / Д.М. Даниленко, Н.И. Коновалова, А.В. Прокопец и др. // **Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.** – 2013. – Т.68, №1. – С. 73-79.

15. Sominina A. Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012 / A. Sominina, E. Burtseva, M. Erokin, L. Karpova, V. Zarubaev, E. Smorodintseva, N. Konovalova, D. Danilenko et al. // **Am. J. Infect. Dis.** – 2013. – V. 9, #3. – P. 77-93.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГА – гемагглютинирующая активность

КЭ – куриные эмбрионы

РТГА - реакция торможения гемагглютинации

НА – гемагглютинин

НА - нейраминидаза

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук, **Еропкину Михаилу Юрьевичу** за помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор выражает глубокую признательность ведущему научному сотруднику, к.б.н. Смирновой Татьяне Дмитриевне за предоставление и поддержание клеточных линий, использованных в работе, а также за неоценимую помощь, оказанную в ходе выполнения данной работы. Автор приносит благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии за помощь в проведении реакции ОТ-ПЦР в реальном времени и секвенировании вирусов гриппа. Особую благодарность автор выражает н.с. Комиссарову Андрею Борисовичу за помощь во всех разделах работы, связанной с молекулярно-генетическим анализом вирусов гриппа. Автор также благодарит ст.н.с., к.б.н. Еропкину Елену Михайловну за неоценимую помощь, оказанную при оценке активности нейраминидазы. Автор выражает искреннюю признательность всем сотрудникам лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа, и в особенности Коноваловой Надежде Игоревне, за всестороннюю поддержку и помощь при выполнении текущего исследования. Особую признательность за консультативную помощь и поддержку на всех этапах выполнения работы автор выражает профессору, академику РАН Киселеву Олегу Ивановичу.