

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
М.Ю. Еропкин

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Пандемии гриппа: краткий обзор.....	15
1.2. Механизмы формирования эпидемических/пандемических вирусов гриппа.....	17
1.2.1. Гипотезы о возникновении пандемических штаммов.....	22
1.2.2. Гипотезы «вымирания» пандемических штаммов.....	25
1.3. Пандемический грипп А(Н1N1)pdm09.....	27
1.3.1. Краткий обзор событий пандемии 2009-2010 гг. в мире и в РФ.....	27
1.3.2. Биологические свойства вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.....	32
1.3.3. Эволюция и механизмы изменчивости вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н1N1)pdm09.....	42
1.3.3.1. Вирусы гриппа А(Н1N1) 1918-2009 гг.....	42
1.3.3.2. Изменчивость НА вирусов гриппа А(Н1N1) 1918-2009 гг. выделения и роль позитивной селекции.....	52
1.3.3.3. Эволюционная изменчивость НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.....	54
1.3.3.4. Биологические свойства и эволюционная изменчивость НА вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н1N1)pdm09.....	59
1.4. Заключение.....	66
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	67
2.1. Материалы исследования.....	67
2.2. Методы исследования.....	71
ГЛАВА 3: СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	79
3.1. ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09	79
3.1.1. Выделение вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с использованием клеточных линий MDCK, MDCK-Siat1, CaCo-2 и куриных эмбрионов.....	79
3.1.2. Заключение.....	86

3.2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09 И ДРУГИХ ВИРУСОВ ГРИППА А ПТИЦ, ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА.....	88
3.2.1. Особенности репликации вирусов гриппа птиц, животных и человека в перевиваемых культурах клеток.....	88
3.2.1.1. Отбор и восстановление музейных штаммов вирусов гриппа А.....	89
3.2.1.2. Сравнительное изучение репродукции вирусов гриппа А на клеточных культурах человека и животных.....	91
3.2.2. Особенности гибели перевиваемых клеток человека в культуре при инфицировании вирусами гриппа птиц, животных и человека.....	95
3.2.2.1. Изучение апоптоза в клеточных линиях человека с использованием световой люминесцентной микроскопии и красителя Hoechst-33258.....	95
3.2.2.2. Использование биохимических маркеров для выявления апоптоза, индуцируемого вирусами гриппа А, в клеточных линиях человека.....	98
3.2.3. Характеристика активности NA вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с другими вирусами гриппа птиц, животных и человека.....	101
3.2.4. Заключение.....	105
3.3. АНТИГЕННЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09, выделенных в 2009-2013 гг.....	106
3.3.1. Сравнение данных антигенного анализа, полученных с использованием хорьковых и крысиных антисывороток.....	106
3.3.2. Антигенный анализ вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 2009-2013 гг. Выделения.....	110
3.3.3. Изучение антигенных свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с использованием крысиных антисывороток, полученных к современным вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенным на куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK.....	119
3.3.4. Антигенные карты для вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.....	122
3.3.5. Заключение.....	124

3.4. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09, ОПРЕДЕЛЯЕМОЕ ПОВЕРХНОСТНЫМИ БЕЛКАМИ ВИРУСА ГРИППА.....	126
3.4.1. Анализ аминокислотного состава НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 гг.....	126
3.4.2. Роль мутации D222G в НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и ее взаимосвязь с тяжелыми случаями течения гриппа.....	138
3.4.3. Оценка сайтов позитивной селекции в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Филогенетические группы.....	141
3.4.4. Анализ аминокислотного состава НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 гг.....	146
3.4.5. Оценка сайтов позитивной селекции в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Филогенетические группы.....	154
3.4.6. Заключение.....	157
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	158
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	183
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	187
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	213
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	217

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

HA - гемагглютинин

MUNANA - 2-4(4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминная кислота

NA - нейраминидаза

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ГПЗ – гриппоподобное заболевание

КЭ – куриные эмбрионы

РГА – реакция гемагглютинации

РТГА – реакция торможения гемагглютинирующей активности

СЦ – сотрудничающий центр

Ф.с. – фетальная сыворотка

ВВЕДЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, отмечалось спорадическое инфицирование людей такими штаммами, 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 А(Н1N1)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. Щелканова, М.Ю. Еропкина, М.П. Грудинина, 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, приведший 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 в разных клеточных линиях и индукцию апоптоза, вызываемого вирусами A(H1N1)pdm09, в сравнении с эпидемическими вирусами гриппа человека, 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. При этом установлено, что генетическое разнообразие этих вирусов позволяет выделять не менее 8 генетических групп, большинство из которых было зарегистрировано в России.

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 также сравнима с таковой для вирусов гриппа свиней и штаммов эпидемического гриппа подтипа А(Н1N1). Изучена нейраминидазная активность широкого спектра вирусов гриппа птиц, свиней и человека, и установлено, что нейраминидаза вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 обладает активностью, сравнимой 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.

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 A(H1N1)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 A/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 A(H1N1)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 (A/Санкт-Петербург/27/2011, A/Санкт-Петербург/100/2011, A/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 как 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), так и 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 А(Н1N1)рdm09 наблюдается тенденция к более предпочтительному размножению в куриных эмбрионах, чем на клеточной культуре MDCK, а 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 А(Н1N1)рdm09, 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 А(Н5N1) 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 А(Н1N1)рdm09, 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 А(Н1N1)рdm09. Основные аминокислотные замены в НА произошли вблизи рецептор-связывающего сайта (позиция 222), а также в позициях 83 (антигенный сайт С_b), 203, 321, 499. В НА 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 НА 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 НА 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, консультациях 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 адекватных 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 7 статьях в 3 реферируемых российских журналах из списка ВАК и в 2 международных журналах, а также в тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 229 печатных листах, состоит из: введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных исследований, обсуждения, заключения, списков литературы и иллюстративного материала, а также 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.

Глава 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Пандемии гриппа: краткий обзор

Вирусы гриппа А широко распространены в природе и поражают как людей, так и целый ряд млекопитающих и птиц. В настоящее время известно 18 подтипов гемагглютинина (HA) и 11 подтипов нейраминидазы (NA) вирусов гриппа А, циркулирующих среди позвоночных (Tong S. et al., 2013). Природным резервуаром всех вирусов гриппа типа А служат водоплавающие птицы. У них вирусы гриппа вызывают инфекцию кишечного тракта без видимых клинических проявлений. Большинство известных подтипов вирусов гриппа циркулируют именно среди диких водоплавающих птиц, и они рассматриваются как предшественники всех вирусов гриппа А, обнаруживаемых у других видов позвоночных, включая человека (Olsen B. et al., 2006). Вирусы гриппа А водоплавающих птиц могут передаваться домашней птице (например, при использовании одних и тех же водоемов, т.к. в подходящих условиях они сохраняются в воде около месяца), вызывая спорадические вспышки заболеваемости. Несколько линий вирусов гриппа А различных подтипов закрепились в популяции домашней птицы и теперь их эволюция протекает независимо от эволюции вирусов, циркулирующих в диких птицах. В отличие от асимптоматической инфекции кишечного тракта, вызываемой вирусами гриппа А у диких водоплавающих птиц, при инфицировании домашней птицы наблюдается инфекция респираторного тракта с умеренными клиническими проявлениями. Вирусы, вызывающие такой тип инфекции, называют низкопатогенными вирусами гриппа птиц, или LPAIV (low pathogenic avian influenza viruses). Однако у кур и индеек некоторые вирусы гриппа А подтипов А(Н5) и А(Н7) вызывают системную инфекцию с поражением многочисленных внутренних органов, характеризующуюся высокой и быстрой смертностью. Такие вирусы принято называть высокопатогенными вирусами гриппа птиц, или HPAIV (highly pathogenic avian influenza viruses) (Kuiken T. et al., 2005). Вирусы гриппа птиц могут инфицировать млекопитающих: они могут вызывать отдельные случаи заболевания, локальные вспышки и крупные эпидемии. В последнем случае это приводит к адаптации вируса к новому хозяину и его устойчивой циркуляции в новой популяции. Такие случаи передачи вируса

отмечены для свиней, лошадей и собак, у которых некоторые подтипы вирусов гриппа А циркулируют и эволюционируют независимо от вирусов гриппа птиц (Reperant L.A., Osterhaus D.M.E., 2013).

Пандемии гриппа вызываются вирусами гриппа А животных – птиц или млекопитающих - попадающими в человеческую популяцию, не имеющую (устойчивого) предсуществующего иммунитета к данному подтипу возбудителя. Все охарактеризованные на сегодняшний день пандемии были вызваны вирусами гриппа птиц или свиней (см. рис.1.1).

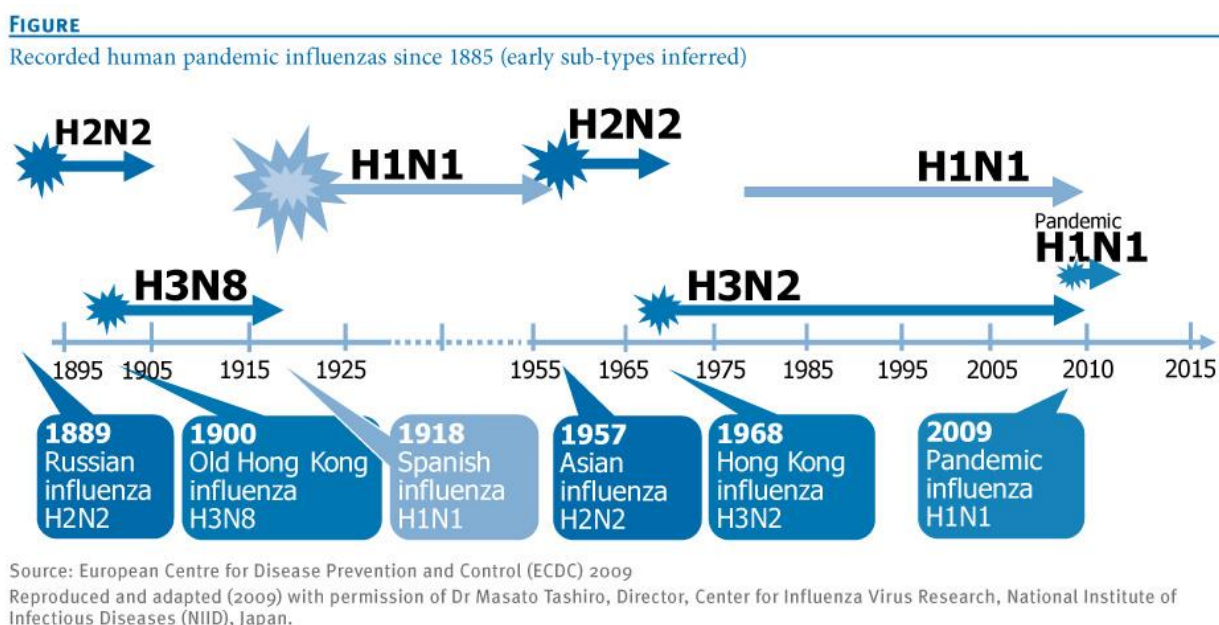


Рисунок. 1.1. Временная шкала с нанесенными пандемическими событиями и этиологическими агентами пандемий (по книге *Pandemic influenza*, 2nd ed., 2013).

Пандемия – это редкое событие, возникающее с периодичностью раз в 10-40 лет. Для развития пандемии должны быть соблюдены 4 основных критерия (Monto A.S., Sellwood C., 2013):

1. Необходимо возникновение принципиально нового вируса гриппа типа А антигенно отличного от циркулирующих предпандемических штаммов, способного устойчиво циркулировать в человеческой популяции
2. В популяции не должно существовать сколько-нибудь значимого предсуществующего иммунитета к новому возбудителю

3. Новый агент должен вызывать значимую клиническую картину заболевания
4. Вирус должен эффективно передаваться от человека к человеку, что обеспечит его глобальное распространение

По данным вирусологических, иммунологических и сероархеологических исследований, эпидемии и пандемии, начиная с 1889 г., были вызваны вирусами, имеющими гемагглютинины подтипов Н1, Н2 или Н3 и нейраминидазы N1 или N2. Эти возбудители объединены в три подтипа вируса гриппа А человека: А (Н1N1), А (Н2N2) и А (Н3N2). В появлении данных подтипов в человеческой популяции прослеживается определённая цикличность (Cox N. J., Kawaoka Y, 1998; Cox N. J., Subbarao K., 2000).

За последние 100 лет зафиксированы и изучены 4 пандемических цикла вируса гриппа. Подтип вируса гриппа с антигенной формулой А (Н1N1) и его варианты HswN1, H0N1, H1N1, H1N1pdm09 вызвали пандемии и эпидемии 1918-1928 гг., 1929-1946 гг., 1946-1956 гг., 2009- 2010 гг., 2010 – (и по настоящее время) - соответственно. Подтип вируса гриппа А (Н2N2) был причиной пандемии и последующих эпидемий в течении 1957-1968 гг. В конце 1968 г. на смену этому возбудителю пришел вирус гриппа А (Н3N2), на фоне активной циркуляции которого в 1977 г. на эпидемическую арену вернулся вирус А (Н1N1) (Webby R. J., Webster R. G., 2003; Monto A.S., Sellwood C., 2013).

1.2. Механизмы формирования эпидемических/пандемических вирусов гриппа

Вирусы гриппа А подвергаются двум видам антигенных изменений. Появление принципиально новых подтипов вирусов гриппа связано с резкой сменой поверхностных белков вируса - гемагглютинина и/или нейраминидазы - и называется антигенным «шифтом» (Nelson M.I., Holmes E.C., 2007). Сегментированность генома вируса гриппа обеспечивает возможность реассортации вирусных геномов в том случае, если животное или человек были одновременно заражены разными вирусами гриппа. В процессе реассортации НА вируса гриппа (и реже NA) могут быть замещены соответствующим геном,

кодирующим белок другого подтипа. При этом сегменты, кодирующие внутренние белки вируса, могут остаться без изменений, а могут также подвергаться реассортации.

Типичным примером реассортации вирусов гриппа птиц и вирусов гриппа человека могут служить вирусы, вызвавшие пандемии 1957 и 1968 гг. Имеются убедительные доказательства того, что пандемические варианты – азиатский 1957г. и гонконгский 1968 г. – возникли в результате реассортации между человеческими и птичьими вирусами. Так, пандемический вирус 1957 г. возник за счет реассортации вирусов гриппа человека A(H1N1) с вирусами гриппа птиц A(H2N2), в результате чего новый пандемический вирус содержал гены гемагглютинина, нейраминидазы и одного из белков полимеразного комплекса (PB1) вирусов гриппа птиц. Вирус A(H3N2) 1968 г. содержал гены гемагглютинина и полимеразы PB1 гриппа птиц. Остальные пять (или шесть) генов этих пандемических штаммов схожи с аналогичными генами более ранних человеческих вирусов A (H1N1) и A (H2N2). Ещё одним примером реассортации вирусов гриппа является выделение вирусов с антигенной формулой A (H1N2). Хотя подтипы вируса гриппа A (H1N1) и A (H3N2) социркулируют с 1977 г., появление реассортантных комбинаций HA и NA этих субтипов встречалось крайне редко. Впервые A (H1N2) реассортант был обнаружен в Японии в 1983 г. в единичном случае (Nakajima S. et al., 1983). В сезон 1988-1989 г.г. подобные вирусы циркулировали в Китае, в 1994 впервые зарегистрированы в Англии, а на сегодняшний день вирусы A (H1N2) обнаружены в 20 странах на четырёх континентах (Brown I.H. et al., 1995; Brown I.H. et al., 1998; Guo Y. et al., 1992). Изучение ранних и более поздних случаев реассортации указывало на то, что данные вирусы могли появиться в Южной Азии и постепенно распространиться в Африке, Европе и Северной Америке, при этом они не вызвали обширной пандемии и не являлись причиной тяжёлых случаев или случаев с летальным исходом. Вероятно, это связано с их антигенной и генетической структурой, которая по результатам проведённых исследований оказалась подобной современным вирусам гриппа, широко циркулирующим во всём мире. Так, HA данных реассортантов был родственен HA кандидата в вакцинные штаммы A (H1N1) A/Новая Каледония/20/99, а NA и 6 внутренних генов были подобны генам вируса A (H3N2) A/Москва/10/99, который также входил в состав

гриппозной вакцины. Однако наиболее «сложным» примером реассортации генетических сегментов вирусов гриппа при формировании пандемических штаммов безусловно можно считать вирус A(H1N1)pdm09, вызвавший пандемию 2009-2010 гг. Новый пандемический штамм, возникший и широко распространившийся в мире в 2009 г., является тройным реассортантом (см. рис.1.2). Сегменты PB2 и PA имеют «птичье» происхождение и были интродуцированы в популяцию вирусов гриппа свиней в 1998 г. Сегмент PB1 происходит от вирусов гриппа человека подтипа А (H3N2), но, как известно, этот сегмент также был получен в результате реассортации с вирусами гриппа птиц в 1968 г. Сегменты HA, NP, NS филогенетически близки генам вируса 1918 г. и принадлежат линии так называемого «классического» гриппа свиней, в то время как оставшиеся сегменты NA и М относятся к Евроазиатской линии вирусов гриппа свиней и были интродуцированы в популяцию в 1979 г.

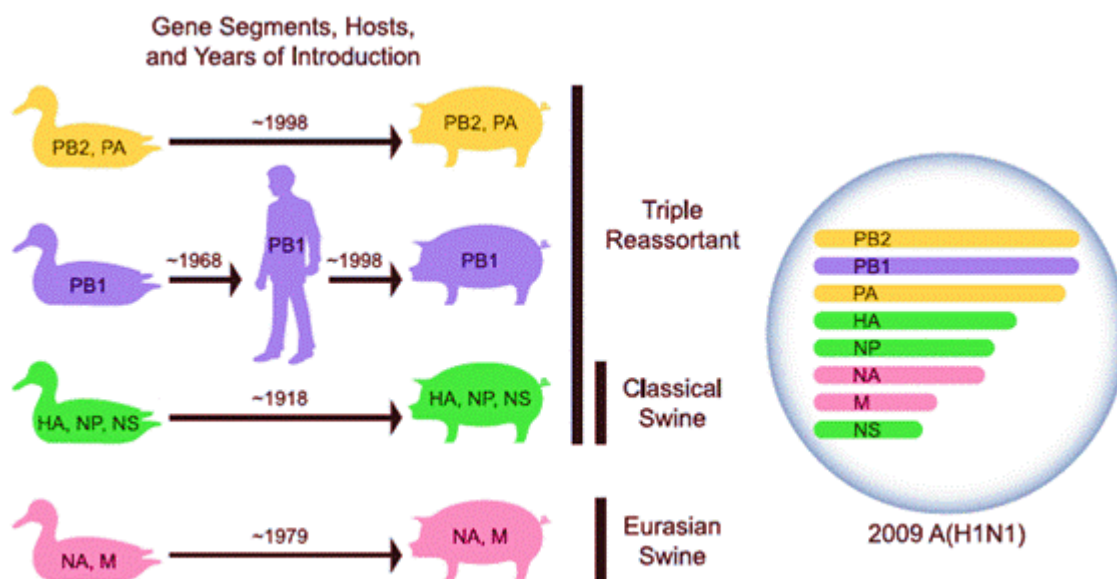


Рисунок 1.2. Происхождение геномных сегментов вирусов пандемического гриппа 2009 г (Garten R. et al., 2009).

Другой тип антигенных изменений, характерный для вирусов гриппа, называется антигенным дрейфом. Антигенный дрейф происходит в результате точечных мутаций в геноме, что в свою очередь приводит к изменению антигенных детерминант белков до такой степени, что они перестают распознаваться иммунной системой хозяина. Именно мутации, включающие замены, делеции и

инсерции, ответственны за возникновение новых антигенных вариантов. Постоянные изменения областей HA и в меньшей степени NA, которые распознаются антителами, помогают вирусу гриппа ускользать от иммунитета хозяина (Gorman O.T. et al., 1992; Webster R.G. et al., 1992; Wilson I.A. et al., 1981). Однако если изменения происходят в высоко консервативных участках HA или NA или количество замен достаточно велико, может произойти существенное нарушение структуры и функций белков вируса, и такие изменения не фиксируются естественной селекцией. Интенсивность антигенного дрейфа вирусов косвенно можно отследить по замене штаммов, входящих в состав гриппозных вакцин. Так, за период десятилетний период 2003 – 2013 гг., наибольшей антигенной вариабельностью обладали вирусы гриппа A(H3N2), вакцинный штамм которых менялся 7 раз в течении этот периода, у вирусов гриппа B – 6 раз, а у вирусов гриппа A(H1N1) – 4 раза.

Под воздействием коллективного иммунитета населения происходит отбор вирусов, отличающихся по особенностям поверхностных антигенов от исходного родительского штамма. При этом отдельные гены вируса гриппа человека аккумулируют мутации почти с постоянной скоростью, что позволяет говорить о «молекулярных часах» вируса гриппа (He C.Q. et al., 2008). Антигенные (дрейфовые) варианты вирусов гриппа A появляются и доминируют в течение 2-8 лет, а затем замещаются следующей антигенной разновидностью. Необходимо добавить, что постоянный уровень гетерогенности штаммов, циркулирующих в один и тот же эпидемический сезон, служит хорошим фоном для природной селекции, затрудняя, однако правильный выбор вакцинного штамма (Hay A.J. et al., 1994; Koelle K. et al., 2006).

Еще одним механизмом изменчивости вирусов гриппа являются процессы реассортации, происходящие внутри одного подтипа и даже антигенного варианта. В некоторых странах были выявлены множественные реассортантные случаи между различными филогенетическими линиями и подгруппами циркулирующих вирусов гриппа A(H3N2). Яркий пример – вирусы гриппа A(H1N1), вызвавшие крупную эпидемию в 1947 г. Установлено, что гемагглютинин этих вирусов принципиально отличался от HA ранее циркулировавших штаммов и

сформировался в результате внутритиповой реассортации (Zimmer S.M., Burke D.S., 2009). Отличия были настолько сильны, что вирусы данной антигенной характеристики получили собственное наименование («А-прим», по старой классификации; ранее циркулировавшие вирусы обозначались как А0). Т.о. не только антигенный дрейф, но и генетическая реассортация может способствовать вариабельности вирусов гриппа А (Holmes E.C. et al., 2005; Lindstrom S. et al., 1998; Shen J. et al., 2009).

Безусловно, реассортация является одним из наиболее важных механизмов изменчивости вирусов гриппа, однако существует достаточное количество данных, что вирусы гриппа А подвергаются различным формам негомологичной рекомбинации. Описаны случаи рекомбинации между генами НА и нуклеопротеина и полимеразными комплексами человеческих и свиных линий вируса гриппа А (Orlich M. et al., 1994; Boni M.F, 2008; Hao W, 2011). Возможность механизма рекомбинации в мутировании вирусов гриппа была отмечена и в других работах, а анализ структуры генов вирусов гриппа позволяет выявить характерные участки НА, NA и NS генов, которые можно отнести к потенциальным рекомбиногенным областям (Киселев О.И., 2005). Выявлен природный случай рекомбинации гена НА птиц (подтипа Н7) с клеточной 28pРНК, в результате чего сайт кливеджа увеличился на 30 АК, а вирус приобрел высокопатогенные свойства (He C.Q et al., 2009). Возможность такого типа рекомбинации была известна ранее, однако получение подобных штаммов было описано только в лабораторных условиях. Внутригенная рекомбинация, на фоне одновременной циркуляции, а, следовательно, и репликации, различных подтипов вируса гриппа А, может привести к значительному дрейфу или шифту вируса (Monto A.S., 2005; Worobey M., Holmes E.C., 1999).

Подводя итог, можно заключить, что для вирусов гриппа А характерны следующие механизмы изменчивости:

1. Антигенный шифт, в основе которого лежит реассортация генов поверхностных и внутренних белков, относящихся к различным подтипам вируса гриппа А, в том числе и к вирусам гриппа животных и птиц.

2. Антигенный дрейф, обусловленный точечными мутациями, короткими делециями и инсерциями, приводящий к аминокислотным изменениям белков вируса, а, следовательно, и к изменению антигенных свойств.
3. Реассортация генов поверхностных и внутренних белков, внутри одного подтипа вируса гриппа А, что приводит к ещё большему антигенному разнообразию штаммов, циркулирующих в один и тот же период времени.
4. Внутригенная и межвидовая рекомбинация, как механизм усиления патогенности и антигенной изменчивости.

1.2.1 Гипотезы о возникновении пандемических штаммов

Анализ механизмов изменчивости вирусов гриппа позволил сформировать представления о возникновении новых пандемических вирусов и их распространении в человеческой популяции.

Предложено несколько концепций, рассматривающих механизмы возникновения новых пандемических вариантов. Каждая из них по-своему решает проблему происхождения пандемических вирусов. В основе многочисленных теорий о возникновении пандемических вариантов вируса гриппа лежат антропонозная и зоонозная гипотезы. Согласно антропонозной гипотезе, одним из способов сохранения вирусов гриппа А в человеческой популяции является его персистенция в организме людей (Сморозинцев А.А., 1975, 1984; Смородинцев А.А. и др., 1979; Hope-Simpson R.E., Golubev D.A., 1987). Сторонники этой гипотезы предполагают, что после пандемий/эпидемий вирусы гриппа не исчезают из человеческой популяции вообще, а продолжают циркулировать среди людей как вирусная инфекция в хронической или латентной форме. Через многие месяцы и даже годы вирус способен реактивироваться. Некоторые исследователи полагают, что именно с этим феноменом связаны случаи выделения так называемых антигенных анахронизмов, т.е. вирусов гриппа с антигенной структурой прошлых (или последующих) пандемий. По-видимому, наличие латентной и персистентной инфекции может объяснить механизм антигенного шифта и повторные включения в циркуляцию основных подтипов вируса гриппа А (Hope-Simpson R.E., Golubev D.A., 1987). Другие факты, лежащие в основе антропонозной теории связаны с лабораторным надзором за гриппом и свидетельствуют о том, что после активной

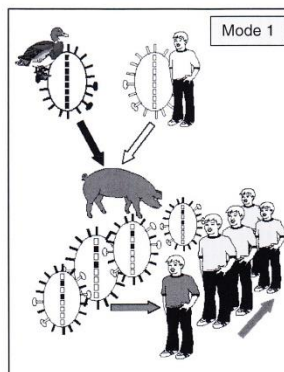
циркуляции вирусы гриппа А «человеческих» подтипов (H1N1, H2N2, H3N2) не покидают популяцию людей, а продолжают в ней оставаться, о чем свидетельствуют данные серологических исследований, случаи выделения нетипичных вирусов, а также наиболее яркий факт – возвращение на эпидемическую арену вируса А(H1N1) в 1977 г. Стоит отметить, что механизмы сохранения вирусов в человеческой популяции согласно данной теории предполагают «генетическую консервацию генофонда вирусов практически без мутаций» (Голубев Д.Б., Солоухин В.З., 1989).

Вторая принципиальная концепция происхождения пандемических штаммов – зоонозная. В основе этой концепции лежит идея о том, что пандемические штаммы вирусов гриппа А формируются за счет реассортации вирусов гриппа человека и вирусов гриппа животных. Такие принципиально новые варианты вируса попадают в человеческую популяцию, не имеющую значимого коллективного иммунитета к новому вирусу, и потому распространение пандемических штаммов происходит стремительно и вызывает резкий подъем заболеваемости. Хотя большинство из зарегистрированных пандемических вирусов были получены в результате реассортации вирусов гриппа человека и вирусов гриппа птиц, многие исследователи полагают, что такие вирусы в редких случаях способны эффективно инфицировать людей и устойчиво передаваться от человека к человеку (Kawaoka Y. et al., 1989). Для этого им необходима дополнительная адаптация, возможно, с использованием промежуточного хозяина. В роли такого хозяина рассматривают свиней, поскольку эти животные чувствительны как к вирусам гриппа птиц, так и вирусам гриппа человека (Scholtissek C. et al., 1978). В этой связи возникла теория о том, что свиньи являются «смешивающим сосудом» для формирования новых шифтовых вариантов вирусов гриппа, поражающих людей, в том числе и пандемических (Brown I.H. et al., 1995; Ludwig S. et al., 1995; Scholtissek C., 1990;1996). Была также показана возможность передачи не только птичьеподобных свиных вирусов людям, но и реассортантов, содержащих только тот или другой сегмент РНК современных свиных штаммов. Такие реассортанты были изолированы от больных детей в Канаде, США и некоторых странах Европы (Chutinimitkul S. et al., 2008; Scholtissek C., 1996).

Обобщением зоонозной теории может служить рисунок 1.3, на котором приведены три возможных сценария формирования пандемических вирусов согласно зоонозной теории. Наиболее вероятным

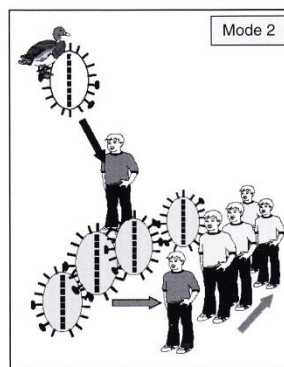
Pandemic mode 1

Pigs have receptors for both avian and human influenza viruses. A doubly infected pig may select a reassortant (mixed gene) virus that could infect and spread among people (as probably happened in 1957, 1968 and 2009).



Pandemic mode 2

Humans could be infected with an avian influenza virus. Through accumulations of point mutations (genetic adaptation) a variant could arise that could spread efficiently from person to person. This mode was probably the mechanism behind the appearance of the A(H1N1) Spanish influenza in 1918.



Pandemic mode 3

Humans could simultaneously be infected with both avian human influenza viruses. A reassortant virus could be selected that could infect and spread among people. So far not a documented pandemic mode, but human–human reassortants have been documented (e.g. A(H3N2) + A(H1N1) to give A(H1N2)).

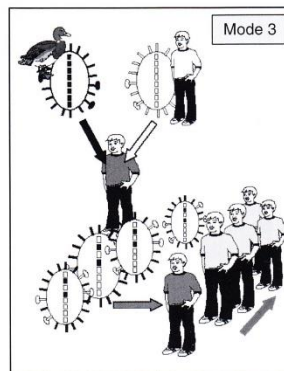


Рисунок 1.3. Механизмы формирования пандемических вирусов гриппа А согласно зоонозной концепции (по Naaheim L.R., Oxford J.S., 2013).

представляется первый сценарий, когда вирусы гриппа птиц и человека коинфицируют свиней, в которых формируются реассортантные вирусы, способные инфицировать человека и эффективно передаваться в человеческой популяции. Второй сценарий – это прямая передача вирусов гриппа птиц к человеку и последующее распространение такого вируса в человеческой популяции. Третий сценарий рассматривается как наиболее редкий, и предполагает одновременное

инфицирование человека вирусами гриппа птиц и человека, что также может привести к формированию нового потенциально пандемического вируса.

Стоит отметить, что в последнее время, говоря о механизмах формирования пандемических вирусов гриппа, нет четко разделения на антропоозную и зоонозную теории, а все больше принято говорить об антропозоонозной теории формирования пандемических штаммов.

1.2.2 Гипотезы «вымирания» пандемических штаммов

Одним из «острых» аспектов антропозоонозной теории остается вопрос об исчезновении предыдущих вирусов гриппа, циркулировавших до прихода пандемических вирусов. Антропоозная теория предполагает сохранение вирусного генофонда за счет хронической формы инфекции, однако уточняет, что вирус сохраняется практически в неизменной форме. В последнее время появилась другая гипотеза о возможных причинах «вымирания» вирусных подтипов (Palese P., Wang T.T., 2011). Авторы этой гипотезы предполагают, что вытеснение предыдущих подтипов вирусов гриппа происходит за счет формирования антител, направленных на стеблевой участок молекулы НА, а также за счет антинейраминидазных антител. Суть гипотезы такова. Несмотря на то, что существует значительное разнообразие подтипов молекул НА в целом, нужно учитывать, что большинство антигенных детерминант, определяющих эту вариабельность, расположены в головке НА. При этом стеблевой участок молекулы НА гораздо более консервативен, и филогенетически, все стебельковые участки молекул НА разных подтипов относятся лишь к двум группам – группе 1 (куда попадают НА подтипов Н1, Н2, Н5 и др.) и группе 2 (НА подтипов Н3, Н6 и др.). Известно, что антитела, формируемые к стебельковому участку НА образуются в меньшем количестве, однако они обладают противовирусной активностью, что показано на животных моделях. Поскольку эти антитела формируются к доменам, обладающим высокой степенью консервативности, они могут быть кросс-реактивными к НА разных подтипов. Так, при пандемии 1957 г. вирус А(Н2Н2) вытеснил ранее циркулировавший А(Н1Н1) за счет кросс-нейтрализующих антител, присутствовавших у большинства взрослого населения, направленных к стебельковому участку молекулы НА, поскольку НА подтипов Н1

и H2 относятся к одной и той же группе. Этого не произошло при последующей пандемии 1968 г, т.к. пришедший вирус принадлежал к другой группе, однако в данном случае, как полагают авторы, решающую роль сыграли антинейраминидазные антитела, т.к. нейраминидаза пандемического вируса 1968 г. не изменилась по сравнению со штаммом 1957 г. Возвращение вируса A(H1N1) в 1977 г. не привело к вытеснению предыдущего штамма, т.к. в этот раз HA опять был из группы, отличной по стебельковому участку от ранее циркулировавшего штамма, да и нейраминидаза была изменена. По-видимому, большая часть населения не имела антител к вирусам A(H1N1), и потому оба подтипа закрепились в популяции. В случае с вирусом пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 и HA, и NA имели ту же антигенную формулу, что и циркулировавший вирус сезонного гриппа A(H1N1). В этой связи авторы предполагают, что антитела, направленные как на стеблевой участок HA, так и на NA вирусом сезонного гриппа A(H1N1) привели к быстрой элиминации этого возбудителя из популяции, как менее приспособленного по сравнению с пандемическим вирусом. Дальнейшее подтверждение своей гипотезы авторы опубликовали в более поздней работе по роли анти-стебельковых нейтрализующих антител в иммунном ответе у животных (Pica N. et al, 2012).

Обзор механизмов изменчивости вирусов гриппа и анализ возможных механизмов формирования пандемических штаммов, также, как и вытеснения отдельных подтипов сезонного гриппа, свидетельствуют о том, что несмотря на большой объем накопленных знаний по эпидемиологии, вирусологии и лабораторной диагностике вирусов гриппа А, на сегодняшний день нет четких механизмов предсказания возможных путей эволюции этого вируса с тем, чтобы определить время и характер будущих пандемических угроз. В этой связи вопросы надзора за изменчивостью вируса гриппа типа А как у людей, так и у животных по-прежнему не теряют своей актуальности. Для того, чтобы повысить уровень готовности к новым угрозам, связанным с пандемическим гриппом, Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) в 2005 инициировала разработку планов пандемической готовности, которые были составлены многими государствами по всему миру. Разработка этого плана была основана на том, что пандемия гриппа развивается поэтапно, и период ее развития можно описать 6-ю фазами развития

пандемии. Однако события последних лет показали, что возникновение и развитие пандемии происходит столь неожиданно и стремительно, что их можно описать всего четырьмя фазами, которые и были введены ВОЗ в 2012 г.: предпандемической, пандемической, пост-пандемической и межпандемической.

1.3. Пандемический грипп A(H1N1)pdm09

1.3.1 Краткий обзор событий пандемии 2009-2010 г в мире и в РФ

В период с 2006 по 2009 год шла интенсивная работа по подготовке к предстоящей пандемии. Это было связано с несколькими событиями. Во-первых, отсутствие пандемических событий с 1977 г говорило о том, что прошел 40-летний период, в течение которого не было зарегистрировано ни одной пандемии. Учитывая циклический характер гриппозных пандемий было очевидно, что появление подобного штамма должно состояться. Среди возможных кандидатов на роль пандемического вируса бесспорное лидерство принадлежало вирусам гриппа A(H5N1), поскольку еще в 1997 г. была зарегистрирована первая вспышка заболеваемости людей данным вирусом птичьего гриппа, а с 2004 регулярно наблюдались случаи инфицирования. Высокий уровень летальности от птичьего гриппа и тяжелейшее течение заболевания у пациентов вызывали опасения о грядущей пандемии невероятной тяжести. В этой связи ВОЗ инициировала программу подготовки к грядущей пандемии с разработкой национальных планов пандемической готовности. Несмотря на то, что этиологическим агентом пандемии стал вирус A(H1N1)pdm09, разработанные стратегии готовности к пандемии во многом предопределили согласованные действия стран и международных организаций, направленные на снижение ущерба и тяжести пандемии. Возможно, именно поэтому первая пандемия 21 века оказалась сравнительно «легкой» по сравнению со всеми предыдущими пандемическими событиями. Вместе с тем, это и наиболее изученная пандемия, позволяющая оценить проведенные мероприятия и оптимизировать планы пандемической готовности на будущее.

В начале 2009 г. в Мексике наблюдались небольшие вспышки заболевания, вызванные вирусом гриппа неизвестной природы. В середине марта уровень

заболеваемости возрос, вместе в нем отмечалось и необычно высокое число случаев тяжелых гриппоподобных заболеваний (ГПЗ) среди молодых прежде здоровых людей. Образцы от больных были отправлены в референс лаборатории в Атланту, США (CDC) и Канаду. В середине апреля в США были диагностированы 2 случая инфицирования детей в Калифорнии и Техасе новым вирусом гриппа свиней, генетический состав которого ранее не встречался среди вирусов, выделяемых от людей. К концу апреля вспышка ГПЗ, вызванная нетипируемым вирусом гриппа А была зарегистрирована на юге США в штатах, граничащих с Мексикой и впоследствии было установлено, что все случаи инфицирования в Мексике и США вызваны вирусом А(Н1N1), ранее не встречавшимся у людей. Вирус был назван «свиным гриппом», и впоследствии обозначен как А(Н1N1)pdm09. Название «свиной» связано с тем, что отдельные комбинации геномных сегментов нового вируса обнаруживалась у вирусов гриппа свиней североамериканской и евроазиатской линий. Эталонными штаммами нового вируса стали штаммы А/Калифорния/04/09 и А/Калифорния/07/09 (WHO, 2009a).

Поскольку случаи ГПЗ в Мексике и США были вызваны одним и тем же новым этиологическим агентом стало очевидно, что новый вирус уже распространяется среди людей, и 25 апреля 2009 г. ВОЗ объявила угрозу общественному здоровью международного значения, связанную с распространением А(Н1N1)pdm09 (WHO, 2009a). Спустя 4 дня стало ясно, что новый вирус обнаружен и в странах Европы (Великобритания, Испания), а также Канады и Новой Зеландии, в связи с чем фаза пандемической опасности была повышена до 5 уровня. В конце мая стало очевидным глобальное распространение А(Н1N1)pdm09 в мире, т.к. случаи его обнаружения подтвердились в Южной и Северной Америках, Европе, Среднем Востоке, Азии и Австралии. 6 июня 2009 г. новый вирус А(Н1N1)pdm09 был детектирован в 214 странах на всех континентах и была зарегистрирована его передача более чем в одном из регионов ВОЗ. Это событие явилось последним критерием для перехода их 5-ой фазы пандемической

опасности в 6-ую фазу и 11 июня 2009 председатель ВОЗ Маргарет Чан объявила первую в 21 веке пандемию гриппа (WHO, 2009b).

Дальнейшее развитие пандемических событий по миру было неодинаковым. Во многих странах северного полушария наблюдалась одна волна пандемического гриппа и подъем заболеваемости часто был связан с началом учебного сезона. Однако в некоторых странах Европы были зарегистрированы две отчетливые волны пандемии в 2009 г, особенно ярко отмеченные для Великобритании, где рост заболеваемости в весенние месяцы сменился резким спадом в связи с началом летних каникул, однако с началом учебного года отмечался резкий подъем заболеваемости и интенсивность второй волны была намного выше первой (см. рис. 1.4). Подобная же ситуация наблюдалась в странах Северной Америки (США, Канада) (Mytton O.T. et al., 2012).

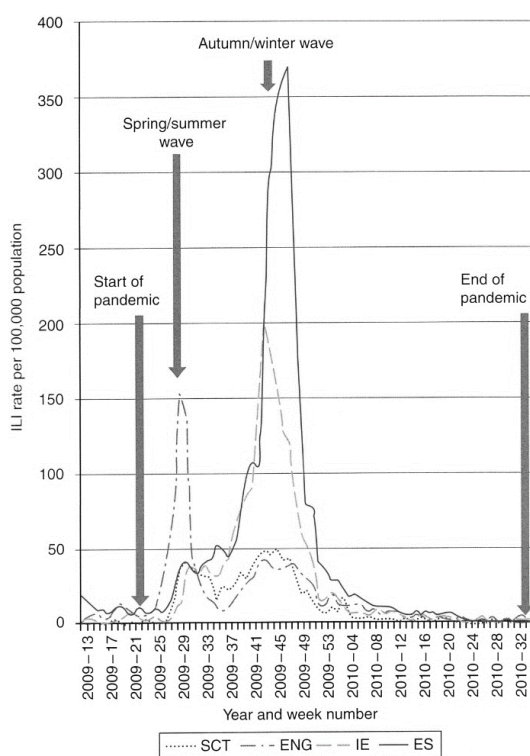


Рисунок 1.4. Пандемические волны (первая и вторая) в Великобритании в период 2009-2010 гг. (по работе Mytton O.T. et al., 2012).

В странах южного полушария развитие пандемии пришлось на середину эпидемического сезона по гриппу (июнь в южном полушарии приходится на зимний сезон). При этом, в Австралии наблюдалось одна волна пандемии, которая развивалась во временном промежутке, характерном для эпидемических сезонов по гриппу (май-сентябрь, с пиком заболеваемости в июле-августе). В Южной Африке наблюдалась другая картина: в начале пандемии в стране регистрировалась эпидемия гриппа, вызванная вирусами A(H3N2), которая впоследствии сменилась волной пандемического гриппа. В странах Южной Америки (например, Аргентине и Чили) также наблюдалась лишь одна волна пандемии в середине 2009 г, как в Австралии и Новой Зеландии, в то время как в Африке, особенно в западной части континента, была отмечена единственная волна пандемического гриппа в середине 2010 г (McMenamin J., Van-Tam J., 2013).

В России с апреля 2009 г. был усилен эпидемиологический надзор за циркуляцией вирусов гриппа. Первый лабораторно подтвержденный случай инфицирования вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 был зарегистрирован 21 мая 2009 г. в Москве, затем отдельные случаи заболевания были зарегистрированы в Санкт-Петербурге и на Дальнем Востоке, однако все эти единичные случаи были завозными. По данным ЦЭЭГ НИИВ в начальном предпандемическом периоде с 11 июня по 15 августа 2009 г было выявлено 73 пациента с инфекцией, вызванной A(H1N1)pdm09 у прибывающих из-за рубежа (Львов Д.К. и др., 2009). Однако учесть все случаи инфицирования было невозможно. Очевидно, что именно в этот период началось широкое распространение пандемического вируса в нашей стране. С 15 августа 2009 г. начался период развития пандемии, в течение которого наблюдался рост числа регистрируемых случаев инфекции A(H1N1)pdm09. Нарастание эпидемических событий, связанных с новым возбудителем стало очевидным в сентябре 2009 г. в Дальневосточном регионе (Южно-Сахалинск, Хабаровск), хотя первые заносы пандемического гриппа на Дальний Восток произошли на 2-2,5 месяца позже Европейской части России, а затем и на западе страны в Калининграде (Щелканов М.Ю. и др., 2010; Львов Д.К. и др., 2010б). В

течение октября - первых недель ноября эпидемия распространилась по всей территории России, а частота подтверждённых случаев пандемического гриппа методом ПЦР на пике эпидемии в Москве и Санкт-Петербурге составляла 49%. К декабрю 2009 г. по данным московского ФЦГ и сотрудничающих с ним территорий было выделено 202 штамма пандемического гриппа, при этом число установленных случаев инфицирования составило 3053 (Львов Д.К. и др., 2010б). В ФЦГ при НИИ гриппа (Санкт-Петербург) было обследовано 1558 материалов от 905 больных и 308 секционных материалов от умерших, выделен 251 штамм пандемического гриппа. За указанный период с сентября по декабрь 2009 г. в обоих центрах по гриппу не было выделено штаммов вирусов гриппа, относящихся к другим антигенным разновидностям, что свидетельствовало о моноэтиологическом характере пандемии 2009 г. С декабря 2009 г. отмечалось снижение уровня заболеваемости гриппом до сезонных уровней, а последующий подъем заболеваемости в начале 2010 г. был связан с возвращением в циркуляцию вирусов гриппа В (Киселев О.И. и др., 2011).

Официальное завершение пандемии было объявлено ВОЗ 10 августа 2010 г. (WHO, 2010b). Однако очевидно, что вирус A(H1N1)pdm09, циркулировавший в пандемический сезон 2009-2010 гг., не сильно отличался от вируса A(H1N1)pdm09, выявляемого в эпидемическом сезоне 2010-2011 гг., и в этой связи многие страны северного и южного полушария наблюдали вторую (и даже третью) волну пандемического гриппа, порой не уступавшую по интенсивности первой волне в год пандемии.

Еще в начале развития пандемии 2009 г. стало ясно, что лица, родившиеся до 1950 г. обладают популяционным иммунитетом к вновь появившемуся вирусу A(H1N1)pdm09 (Lemaitre M., Carrat F., 2010). Наиболее уязвимыми к новому возбудителю оказались дети и подростки (0-4 и 5-14 лет), а наименее подверженными заболеванию лица старше 65 лет, однако и в группе 45-64 лет уровень заболеваемости был намного ниже, чем среди лиц молодого возраста (Riley S. et al., 2011). В группе повышенного риска оказались не только лица с

хроническими заболеваниями дыхательной, эндокринной и других систем, а также иммуносупрессивными заболеваниями, но и лица, страдающие ожирением, что было впервые отмечено за всю историю наблюдения гриппозных пандемий. Особую группу риска составили беременные женщины. Случаи заболевания среди беременных не были чаще, однако вероятность госпитализации беременных и тяжелого течения болезни был в пять-семь раз выше, чем среди других женщин тех же возрастных категорий (Myles P.R. et al., 2012).

1.3.2 Биологические свойства вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09

Появление нового вируса подтипа Н1N1 реассортантной природы ставило вопрос о биологических свойствах этого возбудителя. В этой связи в начальный период пандемии был проведен ряд исследований для сравнительной оценки биологических характеристик вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с сезонными вирусами гриппа А(Н1N1) и другими вирусами гриппа человека, а также вирусами гриппа свиней и птиц.

Поскольку пандемические потенции штамма определяют три основных свойства – новизна для иммунной системы, вирулентность и трансмиссивность – основные исследования по изучению биологических свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 были направлены на изучение этих свойств.

Эпидемиологические данные позволили определить, что пожилые люди старше 60 лет, обычно представляющие основную группу риска при гриппе, поражались новым вирусом достаточно редко, по сравнению с молодыми людьми. Этот феномен был связан с антигенным родством нового вируса А(Н1N1)pdm09 с вирусами 1950-хх гг. циркуляции, в связи с чем у людей старше 60 лет сохранились антитела, способные нейтрализовать вирус пандемического гриппа 2009 г. (Lemaitre M., Carrat F., 2010; Viboud et al., 2010). Еще до объявления пандемии было установлено, что вирус А(Н1N1)pdm09 обладает принципиальными антигенными отличиями от вирусов сезонного гриппа А(Н1N1), и что вакцинация не способна обеспечить защиту против нового вирусного агента (Garten R. et al., 2009).

Для изучения трансмиссивности нового вируса были предприняты серии исследований, включающих изучение рецепторной специфичности вирусов A(H1N1)pdm09, способность к репликации на различных клеточных линиях, как первичных, так и перевиваемых, а также на эксплантах респираторных тканей, и опыты по трансмиссивности пандемического гриппа на животных.

Рецептор-связывающий сайт НА вирусов A(H1N1)pdm09 находится на дистальном конце каждого мономера и, как и у других вирусов гриппа, представлен тремя структурными элементами: 190 спиралью (АК 184-191), 220 петлей (АК 218-225), и 130 петлей (АК 131-135), а также включает консервативные аминокислотные остатки Y91, W150, H180 и Y192 в основании рецептор-связывающего кармана (см. рис. 1.5).

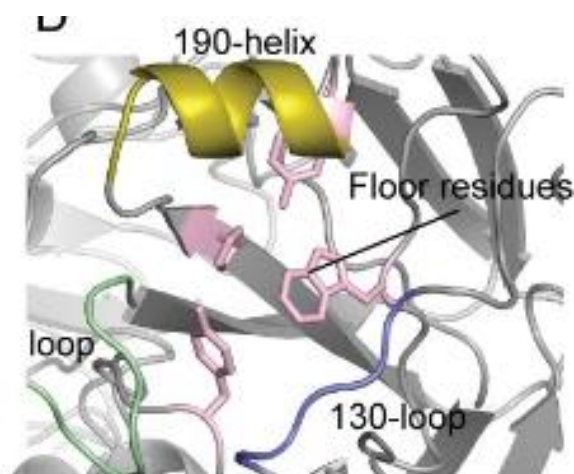


Рисунок 1.5. Структура рецептор-связывающего сайта вирусов гриппа A(H1N1)pdm09. Представлены основные структурные элементы: 190 спираль (желтая), 130 петля (синяя), 120 петля (зеленая). По материалам статьи (Yang H. et al., 2010).

Данные по типу предпочтительного связывания рецепторов для вирусов пандемического гриппа 2009 г. несколько разнятся. Так, ранние исследования, выполненные на вирусах А/Калифорния/04/2009 и А/Гамбург/5/2009 (Childs R.A et al., 2009) выявили двойную рецепторную специфичность, как к сиаловым кислотам с α -2,3 галактозной связью, так и с α -2,6. Однако данные для австралийского

штамма А/Дарвин/2001/2009 и других вирусов пандемического гриппа с использованием олигосахаридного микрочипа однозначно указывают на предпочтительное связывание только рецепторных аналогов с α -2,6 типом связей, и отсутствие взаимодействия с α -2,3 (Yang H. et al., 2010). Этот профиль сравним с вирусом сезонного гриппа А/Брисбен/59/07.

Интересно исследование, проведенное ван Пук с соавторами, на респираторных эксплантах свиней (Van Poucke S.G.M. et al., 2010). Авторы разработали методику получения эксплантов из носовых ходов, трахеи, бронхов и легких свиней, определили распределение и тип сиаловых кислот с использованием растительных лектинов, а также провели сравнительное изучение репликации вирусов гриппа свиней, птиц и человека. В результате было установлено, что сиаловые рецепторы α -2,6 типа встречались во всех протестированных эксплантах, в то время как α -2,3 тип был обнаружен только в бронхах и легких. Эти результаты отличались от полученных в классических работах Ито и Сузуки с соавторами (Ito T. et al., 1997; Suzuki Y. et al., 2000), однако авторы использовали более современные и чувствительные методы анализа, чем возможно и объясняется несколько различный спектр полученных данных. Из этой работы следуют важные выводы. Во-первых, было установлено, что распространение сиаловых рецепторов α -2,3 и α -2,6 типов в респираторном тракте свиньи полностью соответствует таковому у человека. Во-вторых, авторы доказали, что вирусы гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) человека, также, как и вирусы гриппа А(Н1N1) свиней, эффективно реплицируются лишь в эксплантах, полученных из верхних дыхательных путей свиней, в то время как вирусы гриппа птиц подтипа А(Н5N1) реплицировались преимущественно только в эксплантах, выделенных из нижних дыхательных путей. Таким образом было четко показано, что тканевой тропизм вирусов гриппа А различных подтипов определяется типом сиаловых кислот, присутствующих на клетках соответствующих отделов респираторного тракта.

В этой связи представляют интерес исследования, проведенные китайскими учеными на перевиваемых культурах клеток (Li I.W.S. et al., 2009). Они сравнили эффективность репликации вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 с вирусами сезонного гриппа A(H1N1) и вирусами гриппа птиц A(H5N1) с использованием 13 клеточных линий человека и 4 линий животного происхождения. Репродукцию вируса учитывали по цитопатическому действию (ЦПД), иммунофлуоресценции (ИФ) и количественной ПЦР в реальном времени. В результате было установлено, что вирусы гриппа птиц инфицировали весь спектр протестированных линий, что было подтверждено результатами ИФ и высокой вирусной нагрузкой (10^8 копий РНК/мл). При этом, ЦПД наблюдали во всех линиях животного происхождения, но только в 8 из 13 линий человеческого происхождения, что говорит о том, что некоторые клеточные линии способны поддерживать вирусную репликацию без видимых признаков деградации. Репликация вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 была сравнима с вирусами сезонного гриппа A(H1N1), как по индукции ЦПД, так и по данным ИФ. В большинстве случаев, она была низкой. Лишь одна культура клеток – CaCo-2 (клетки эпителия кишечника человека) – поддерживала репродукцию вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H1N1) на уровне, сравнимом с вирусами гриппа A(H5N1). Данные о высокой перmissивности линии CaCo-2 к различным вирусам гриппа птиц, свиней и человека подтверждены и в работах других исследователей (Жирнов О.П., Кленк Х., 2003, Chiapponi C. et al., 2010, Jahangir A. et al., 2010). Авторы также подчеркивают, что культура клеток почечного эпителия свиней PK-15 была нечувствительной к вирусам гриппа свиней, что, как они считают, свидетельствует о том, что вирусы A(H1N1)pdm09 более адаптированы к размножению в человеке, чем в свиньях.

Изучение патогенетического действия вируса пандемического гриппа в культурах клеток человека CaCo-2 и Calu-3 (культура дифференцированного эпителия бронхов) показало, что в обеих линиях происходит внутриклеточный протеолиз HA0 на HA1 и HA2, т.е. для созревания вирусного HA не требуется добавление эндогенного трипсина, как это необходимо при работе на клетках

MDCK (Жирнов О.П. и др., 2013). Более того, авторы установили, что эти клеточные культуры способны длительное время поддерживать вирусную репликацию в связи со слабой индукцией апоптоза и аутофагии в данных линиях, что позволяет рекомендовать эти линии для выделения вирусов гриппа из проб от людей. Отметим, однако, что более ранние работы авторов указывали на отсутствие апоптотической гибели клеток CaCo-2, приводя убедительные доказательства индукции некротического пути гибели данной клеточной линии при инфицировании различными вирусами гриппа (Zhirnov O.P., Klenk H.D., 2003).

Индукция апоптоза в клетках, инфицированных вирусом гриппа, была описана в 1994 г. Хиншоу с соавторами (Hinshaw V. et al., 1994). Считается, что апоптоз – это основной механизм гибели клеток, инфицированных вирусами гриппа различного происхождения. Интенсивность индукции апоптоза зависит от многих факторов и также является биологической характеристикой вируса. Вирус гриппа способен индуцировать апоптоз как в перmissive клетках (MDCK), так и в неперmissive (HeLa, Raji, SMMC-7721, SPC-A-1) клеточных линиях (Li H. et al., 2003).

В 1997 году была опубликована работа Прайса с соавторами (Price G.E. et al., 1997), в которой они впервые показали, что вирусы гриппа А различных подтипов индуцируют апоптоз с разной интенсивностью. В качестве модельных вирусов были выбраны два штамма: вирус А/Фиджи/15899/83 (H1N1) и реассортантный вирус 7а (гены М и PB2 от вируса А/Пуэрто-Рико/8/34, остальные от А/Англия/939/69 (H3N2)). При одинаковой интенсивности репродукции вирусов на клеточных культурах MDCK и U-937, вирусы индуцировали различную цитотоксичность и апоптоз: вирус подтипа А(H3N2) (7а) индуцировал апоптоз уже через 12 часов после инфицирования; через 48 часов количество клеток, погибших в результате апоптоза для клона 7а составляло 40%, тогда как для вируса А/Фиджи/15899/83 (H1N1) только 10%. Было также доказано, что для индукции апоптоза необходима вирусная репликация, поскольку УФ-инактивированные штаммы не вызывали апоптоз.

Эта же исследовательская группа позднее установила, что вирусная нейраминидаза также принимает участие в индукции апоптоза (Morris S.J. et al., 1999). Используя те же штаммы вирусов гриппа, они показали, что частичный блок индукции апоптоза происходит при добавлении в среду соединений, блокирующих нейраминидазную активность на стадии входа вируса в клетку или раньше. При этом при использовании фетуина в качестве субстрата было установлено, что NA подтипа N2 обладает большей активностью по сравнению с NA подтипа N1. Активные центры обоих ферментов идентичны по аминокислотной последовательности, что указывает на то, что различия в специфичности и активности NA определяют и другие аминокислотные остатки, входящие в состав фермента. Однако роль нейраминидазы в индукции апоптоза, по-видимому, невелика и реализуется на начальной стадии входа вируса в клетку. Вирусы, обработанные UV, теряют способность к репликации, однако сохраняют NA активность более чем на 75%. При этом способность таких инактивированных штаммов вызывать апоптоз очень невелика.

При сравнении выборки из пяти штаммов A(H3N2) и двух штаммов A(H1N1): штамма, выделенного от человека, а также вируса свиней подтипа A(H1N1) - было установлено, что вирусы подтипа A(H3N2) индуцируют высокий уровень апоптоза и вирусной инфекции, в то время как вирусы подтипа A(H1N1), как выделенные от людей, так и от свиней, обладают более низкой инфекционностью и являются слабыми индукторами апоптоза (Mohsin M.A. et al., 2002). Это объясняется более слабой степенью связывания вирусов A(H1N1) с клеточными рецепторами, различием в гликозилировании HA, особенно в районе рецептор-связывающего сайта, и низкой активностью NA подтипа N1.

Анализ серии генетически измененных вирусов с одиночными или тройными заменами сегментов, полученных на основе вирусов 7a и A/Фиджи/15899/83, кодирующих гены HA, NA, M, PA, PB1, PB2, NP, NS не позволил установить влияние какого-то конкретного сегмента или их комбинаций на индукцию апоптоза (Morris S.J. et al., 2005). Это говорит о том, что предсказать интенсивность

вызываемого апоптоза для рекомбинантного вируса невозможно, поскольку на уровень его индукции оказывают влияние как ген, который был интродуцирован, так и генетический фон исходных генов, а также их взаимодействие. Исходя из этих данных, авторы делают вывод о невозможности предсказать степень вирулентности новых штаммов, возникающих в природе.

Работы *in vitro* по сравнению индукции апоптоза у вирусов сезонного гриппа А(Н1N1) и вирусов пандемического гриппа 2009 г. немногочисленны и показывают, что в вирусы А(Н1N1)pdm09 способны вызывать апоптоз с большей интенсивностью, чем вирусы сезонного гриппа А(Н1N1) (Yang N. et al., 2011; Gerlach R.L. et al, 2013). Однако сравнительных исследований с широким спектром вирусов гриппа человека и животных не опубликовано.

Интенсивность индукции апоптоза определяется не только поверхностными белками вируса гриппа, но и многими внутренними белками вируса. Среди них ведущая роль принадлежит белку NS1 (Schultz-Cherry S. et al., 2001; Ehrhardt, C. et al., 2007). В экспериментах Жирнова с соавторами (Zhirnov O.P. et al., 2002) рекомбинантный вирус гриппа, лишенный NS гена, индуцировал более мощный апоптоз по сравнению со штаммом дикого типа. Это объясняется индукцией апоптоза интерфероном, синтез которого не подавлялся белком NS1, что, как отмечают авторы, свидетельствует об антиапоптозной роли NS1. Сейчас установлена многофакторная роль NS1: с одной стороны, он блокирует развитие апоптоза в клетке на ранних стадиях репликации, а с другой стороны активирует апоптоз на поздних стадиях жизненного цикла, что может способствовать дальнейшему распространению вируса в соседние клетки (Ludwig S. et al., 2006).

Важнейшая роль в индукции апоптоза также отводится белку PB1-f2, описанному в 2001 г. (Chen W. et al., 2001). Этот небольшой по размерам белок PB1-F2 – 87 аминокислот – содержит последовательность митохондриальной локализации (Gibbs J.S. et al., 2003) и взаимодействует с белками ANT3 (транслокатор адениновых нуклеотидов) на внутренней мембране митохондрий и

с ионным каналом VDAC1 (voltage-dependent anion channel) на внешней митохондриальной мембране, которые вовлечены в изменение проницаемости митохондриальной мембраны в процессе апоптоза (Zamarin D. et al., 2005). Установлено, что добавление синтетического PB1-F2 к клеткам приводит к запуску апоптоза, а штаммы, неспособные к экспрессии PB1-F2 индуцируют более слабый апоптоз в человеческих моноцитах, чем штаммы дикого типа (Chen W. et al., 2001). Однако последующие исследования позволили установить, что PB1-F2 варьирует по длине, экспрессируется лишь у некоторых штаммов вирусов гриппа и локализуется не только в митохондриальной мембране, но также в ядре инфицированных клеток (Chen C.J. et al., 2010). Ряд исследователей указывает на то, что эффекты PB1-F2 штаммоспецифичны и очень сильно зависят от конкретных условий проведения эксперимента (клеточной линии, вирусного штамма), а фосфорилирование PB1-F2 и его роль в работе полимеразного комплекса не влияют на патогенез (McAuley J.L. et al., 2010).

Исследования, посвященные репликации вирусов A(H1N1)pdm09 в культурах клеток различного происхождения, и изучение их способности индуцировать апоптоз различной интенсивности позволяет сделать выводы о возможной вирулентности/патогенности вирусов данного подтипа. Так, на основании опытов, проведенных *in vitro*, можно заключить, что вирусы пандемического гриппа 2009 г., также, как и вирусы сезонного гриппа, обладают выраженной рецепторной специфичностью в отношении сиаловых кислот с α -2,6 типом связи, и, соответственно, эффективно прикрепляются к клеткам-мишеням расположенным в верхних дыхательных путях. Для репликации в нижних отделах респираторного тракта необходимы изменения в рецептор-связывающем сайте молекулы HA. Поскольку эти вирусы несут нейраминидазу подтипа N1 они индуцируют апоптоз невысокой интенсивности, и потому их репликация во многих клеточных линиях не может быть детектирована за счет ЦПД. Все биологические свойства вирусов A(H1N1)pdm09, протестированные *in vitro*, указывают на то, что

это низкопатогенные вирусы, близкие по характеристикам к штаммам сезонного гриппа А(Н1N1).

Для изучения трансмиссивности и вирулентности вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 были проведены многочисленные опыты на животных. При изучении трансмиссивности вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с вирусами гриппа А(Н5N1) на модели морских свинок было показано, что эффективность передачи вирусов гриппа птиц намного превосходит таковую для вирусов пандемического гриппа 2009 г. (Дубровина И.А., 2013). При изучении трансмиссивности вирусов А(Н1N1)pdm09 в сравнении с вирусами сезонного гриппа А(Н1N1) на модели хорьков разные группы исследователей получили различающиеся результаты. Так, группа под руководством Майнса установила, что вирусы пандемического гриппа 2009 г. обладали более низкой трансмиссивностью по сравнению с вирусами А(Н1N1) (Maines et al., 2009). Противоположные результаты были получены другим коллективом авторов, которые постулировали более высокую трансмиссивность вирусов пандемического гриппа 2009 г. по сравнению со штаммами сезонного гриппа (Perez et al., 2009). При этом в опытах голландских исследователей трансмиссивность вирусов А(Н1N1)pdm09 и А(Н1N1) оказалась равной (Munster V. et al., 2009). Стоит отметить, что клинические проявления инфекции у хорьков и мышей, описанные разными исследовательскими группами, носили схожий характер. Так, еще в начале пандемии было установлено, что вирусы А(Н1N1)pdm09 способны эффективно вызывать инфекцию у мышей без предварительной адаптации. При этом, течение инфекции у мышей было схожим для обоих подтипов вирусов, и характеризовалось легким или средним течением болезни (Belser J. et al., 2009; 2011; Bouvier N.M., Lowen A.C., 2010). Другая картина наблюдалась при инфицировании хорьков. У хорьков, зараженных вирусами сезонного гриппа А(Н1N1) наблюдалось легкое течение болезни, вирус регистрировался в носовых пазухах и в верхних отделах респираторного тракта. Репликации вируса в нижних отделах респираторного тракта не выявлялось (Maines T. et al., 2009; Guarner J., Falcon-Escobedo R. 2009). В

противоположность этому вирусы пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 приводили к развитию выраженных клинических симптомов болезни у хорьков, вирусные антигены определялись как в верхних, так и нижних отделах респираторного тракта. Репликация вирусов A(H1N1)pdm09 у инфицированных хорьков была отмечена в легких в высоких титрах, а выделение вируса было успешным как из верхних, так и из нижних отделов респираторного тракта, а также из образцов кишечного эпителия (Maines T. et al., 2009; Kwon D. et al., 2010). Мыши и хорьки также послужили моделью для доказательства того, что вирусы гриппа, как пандемического, так и сезонного, могут попадать в организм не только через микрокапли во вдыхаемом воздухе, но и через слизистую оболочку глаз, содержащую сиаловые рецепторы, схожие с таковыми в респираторном тракте (Belser J. et al., 2009; Belser J. et al., 2013). При этом, инфекционная доза, необходимая для инфицирования восприимчивых животных через окулярный путь была даже ниже, чем доза, необходимая для развития болезни при передаче классическим воздушно-капельным путем. Еще одной моделью для изучения патогенности вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 послужили домашние птицы - цыплята и утки, которых инфицировали вирусами гриппа A(H1N1)pdm09 и вирусами гриппа A(H1N1) 1918 г. Ни в одном из случаев клинической картины заболевания не наблюдалось, а в случае с вирусом A(H1N1)pdm09 вирус не определялся методом ПЦР ни в слизистых секретах, ни в тканях зараженных птиц. Более того, 28 дней спустя после инфекции было установлено, что сероконверсия у инфицированных птиц происходила только в ответ на вирус 1918 г. и не наблюдалась ни у одной особи, инфицированной гриппом A(H1N1)pdm09, что позволяет сделать вывод о крайне низком инфекционном потенциале этих вирусов для птиц (Babiuk S. et al., 2010).

Еще одна интересная работа по сравнению биологических свойств вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 с возбудителями прошлых пандемий принадлежит отечественным авторам (Kiseleva I. et al., 2009) и рассматривает вопросы температурной чувствительности вирусов, устойчивость к нейтрализующим

свойствам сывороточных гамма-ингибиторов и способность агглютинировать эритроциты разных млекопитающих и птиц. Вирусы прошлых пандемий (А/Сингапур/1/57 (H2N2) и А/Гонконг/1/68 (H3N2)), а также возбудители крупных эпидемий, демонстрируют выраженную способность к репликации при повышенных температурах (non-ts), устойчивость к сывороточным ингибиторам и неспособность репродуцироваться при пониженных температурах. При изучении свойств вируса А/Калифорния/07/09 было установлено, что, как и эталонные штаммы прошлых пандемий, он обладает всеми характерными свойствами: отсутствием температурочувствительности, устойчивостью к сывороточным ингибиторам и нехолодоадаптированным фенотипом. В реакции гемагглютинации было выявлено, штамм А/Калифорния/07/09 агглютинирует эритроциты цыплят, морской свинки и человека с одинаковой эффективностью. Авторы подчеркивают, что появление антигенно новых штаммов сопровождается non-ts фенотипом, который постепенно, с течением времени сменяется ts-фенотипом, при этом вирусы сохраняют антигенное родство с «родительскими» штаммами, несущими non-ts фенотип. Антигенный дрейф приводит к накоплению мутаций и появлению новых антигенных вариантов, которые, как правило, опять несут non-ts фенотип. Таким образом, отслеживая температурочувствительность природных изолятов вирусов гриппа можно прогнозировать появление новых антигенных вариантов в популяции.

1.3.3 Эволюция и механизмы изменчивости вирусов гриппа А(H1N1) и А(H1N1)pdm09

1.3.3.1. Вирусы гриппа А(H1N1) 1918-2009 гг.

Несмотря на то, что первый вирус гриппа человека был выделен в 1933 г., на сегодняшний день мы имеем возможности проанализировать эволюционную изменчивость вирусов гриппа А(H1N1) почти за 100 лет его циркуляции в человеческой популяции. Это стало возможным благодаря уникальной работе, проведенной Д. Таубенбергером с коллегами по экстракции вирусной РНК из тканей легких от людей, погибших в результате пандемии 1918 г. и последующего

секвенирования фрагментов генома вируса гриппа 1918 г. (Taubenberger J.K. et al., 2001; Taubenberger J.K. et al., 2006). Результатом этих исследований стала расшифровка последовательностей HA вирусов, выделенных от пяти человек. Интересно, что несмотря на то, что эти люди погибли в разных частях света (в США и в Англии), и в разное время (с разницей в 6 месяцев), гомология последовательностей HA вирусов гриппа составила 99%. Наиболее интригующим вопросом было происхождение данного пандемического штамма. Ведь все остальные штаммы, вызывавшие пандемии, были реассортантными. Однако в случае вируса A(H1N1) 1918 г. происхождение пандемического штамма не столь очевидно.

Филогенетический анализ, проведенный Рейд с соавторами (Reid A.H. et al., 1999), четко указывает на то, что HA вирусов 1918 г. расположен в кластере HA подтипа H1 вирусов гриппа млекопитающих, а не птиц, в то время как HA вирусов 1957 и 1968 гг. четко попадают в соответствующие подгруппы HA вирусов гриппа птиц H2 и H3 соответственно. Однако очень многие признаки указывают и на птичье происхождение HA вирусов 1918 г.: это и консервативные для птичьих HA сайты гликозилирования, и рецепторная специфичность, и анализ антигенных сайтов, подвергающихся селекции (Matrosovich M. et al., 1997; Brownlee G.G., Fodor E., 2001). Так, известно, что в HA вирусов гриппа птиц содержится 4 консервативных сайта гликозилирования, в то время как современные вирусы гриппа человека A(H1N1) содержат как минимум пять дополнительных к этим сайтам гликозилирования для маскировки антигенных эпитопов. В HA вирусов 1918 г. обнаружены только 4 консервативных «птичьих» сайта гликозилирования. При сравнении аминокислотных последовательностей, был проведен анализ аминокислотных остатков, которые могут служить мишенью для иммунной системы и потому подвергаются селекции за счет антигенного дрейфа. 37 из 41 таких аминокислот оказались схожими с позициями, обнаруживаемыми в HA вирусов гриппа птиц, что отчетливо указывает на отсутствие иммунологического прерыва на HA вирусов гриппа до 1918 г. (Reid A.H. et al., 1999). Рецептор-связывающий сайт в HA обладает типичной для птичьих вирусов α -2,3

специфичностью, и отличается от консенсуса всего одной аминокислотной заменой E190D.

И несмотря на это, результаты Таубенбергера убедительно указывают на то, что этот вирус не попал в человеческую популяцию напрямую от птиц. Возможно, этот вирус циркулировал в каком-то промежуточном хозяине до того, как попасть в человеческую популяцию, и наиболее вероятным хозяином являются свиньи. Существуют описания клинической картины гриппа у свиней в 1918 г. (Koen J.S., 1919), а также четкие указания на то, что до 1918 г. свиньи не болели инфекционным заболеванием с такой клинической картиной, что свидетельствует в пользу того, что в популяцию свиней вирус A(H1N1) попал именно в 1918 г. (Shope R.E, 1936). Однако вирусы гриппа свиней редко выделяются от человека, что затрудняет предположение о прямом «переходе» вирусов гриппа от свиней к людям как возможном источнике пандемического вируса 1918 г. Более того, в 1979 г. в популяцию свиней в Европе впервые был интродуцирован вирус гриппа птиц подтипа H1N1, и сейчас есть уникальная возможность проследить эволюционную изменчивости вирусов данного подтипа у свиней. Все данные об анализе вирусов «птичьего» гриппа H1N1 в популяции свиней указывают на то, что он сохранил характерные черты своего происхождения несмотря на 20-летнюю эволюцию (Reid A.H., Taubenberger J.K., 2003). Так, уже в 1979 отличия H1N1 у птиц и у свиней составляли от 7 до 12 АК, три из которых располагались в антигенных сайтах. Спустя 20 лет циркуляции, эти отличия составили 17 АК, пять из них зарегистрированы в антигенных сайтах. Филогенетически и вирусы гриппа птиц H1N1, и вирусы гриппа свиней «птичьего» подтипа расположены в одном и том же кладе, что четко указывает на то, что двадцатилетнего периода эволюции вирусов гриппа птиц подтипа H1N в свиньях недостаточно для значительной дивергенции вирусов свиней от предкового вируса птиц. А это означает, что свиньи не могли стать источником вируса пандемии 1918 г.

В поиске ответа на вопрос о загадочном происхождении пандемического штамма 1918 г. М. Воробей и его сотрудники (Worobey M. et al., 2014) применили

особую разновидность филогенетического анализа с использованием метода «молекулярных часов», что позволило им выдвинуть принципиально новую гипотезу о происхождении штамма 1918 г., а также вирусов классического гриппа свиней, и вирусов сезонного гриппа H1N1 периода 1922 по 1957 г. Для обоснования своей гипотезы авторы использовали весь спектр ретроспективных данных о смертности в периоды с 1830 по 1970 гг., сероархеологические данные периода 1890-1980 гг., секвенированные последовательности для вирусов гриппа, начиная с 1917 г., содержание урацила в последовательностях, кодирующих сегменты вирусов гриппа птиц, свиней и человека, а также данные о заболеваемости свиней. Принципиальное отличие их теории происхождения штамма 1918 г. от остальных, выдвинутых ранее, заключается в следующем. Анализ всех фактов привел исследователей к выводу, что вирус подтипа H1 внедрился в человеческую популяцию в 1900 гг. До этого в 1890-1900 гг. циркулировал штамм подтипа H3N8, на что указывают многие данные сероархеологических исследований. Однако после 1900 гг. уровень антител к вирусам гриппа H3 неуклонно снижался в популяции, в то время как в 1904 г. пиковый уровень антител был обнаружен к вирусам подтипа H1. Авторы предполагают, что именно в этот момент произошла интродукция вирусов H1 в популяцию, и возможно (учитывая сохранившиеся антитела к N8 в популяции) возбудитель имел антигенную формулу H1N8. Этот предпандемический штамм циркулировал вплоть до пандемии 1918 г., и за 15-17 лет циркуляции вирусов подтипа H1 среди людей давление отбора привело к диверсификации вирусов данного подтипа и появлению антигенно-разнообразных вариантов подтипа H1. Анализ временного интервала происхождения остальных генов вирусов 1918 г. привел Воробья с коллегами к заключению о том, что все они имеют один и тот же срок возникновения в районе 1915-1916 гг. По-видимому, в период 1915-1917 г. произошла реассортация вирусов гриппа птиц (наиболее вероятно подтипа H7N1) с вирусами гриппа человека, несущими минорный вариант H1 (и вероятнее всего N8). Возникший штамм H1N1 и стал причиной тяжелейших событий 1918-1920 гг. Такая хронология событий хорошо объясняет,

почему HA 1918 попадает в один клайд с вирусами гриппа млекопитающих, хотя и сохраняет многие «птичьи» черты.

Однако дальнейшая эволюция вирусов гриппа H1N1 не была поступательной. Сомнений нет в том, что именно в 1918 г. штамм пандемического гриппа попал в популяцию свиней в Северной Америке, Европе и чуть позднее в Китае (Reid A.H., Taubenberger J.K., 2003). Здесь, этот вирус эволюционировал особым образом, сохраняясь в малоизмененном виде вплоть до 1930 гг., когда он был выделен Шоупом (Shope R., Lewis P., 1931). Впоследствии, именно эти вирусы и будут названы вирусами «классического гриппа» свиней, в противоположность вирусам свиней H1N1, попавшим в популяцию свиней от птиц в 1979 г. Однако как протекала эволюция вирусов гриппа H1N1 у людей в постпандемический период 1920-1940 гг.? Ранее считалось, что в постпандемический период наблюдался постепенный антигенный дрейф вирусов 1918 г, а эволюция вирусов данного подтипа была линейной вплоть до 1957 г. Но существуют серологические данные, которые противоречат этой теории. Аргумент следующий: если вирусы гриппа H1N1 циркулировали без перерывов, начиная с 1918 г. и их эволюция была постепенной, то как объяснить факт, что в 1935 г. Эндриус отметил, что дети, рожденные после 1922 г. не имеют антител к вирусам гриппа свиней, но обладают нейтрализующими антителами к вирусам сезонного гриппа (штамм A/WS/33). В то же время Шоуп показал, что младенцы до 6 месяцев, несущие материнские антитела, и люди старше 20 лет (т.е. 1916 г.р. и старше) имеют в сыворотке антитела, нейтрализующие вирус гриппа свиней (Shope R., 1936). Объяснение этим фактам также следует из современных данных филогенетического анализа. Поскольку вирусы H1 до пандемии 1918г. уже обладали генетическим (а скорее всего, и антигенным) разнообразием, то, несмотря на пандемию 1918 г., эти минорные популяции H1 в человеческой популяции сохранились. Современные данные указывают на то, что в постпандемический период 1920-1922 гг. наиболее вероятно произошло еще одно событие реассортации/рекомбинации по HA, между вирусом пандемического гриппа 1918 г. и одним из минорных вариантов ранних

вирусов H1N8. Таким образом, в 1922 г. в человеческой популяции стали широко распространяться новые реассортантные вирусы H1N1, которые были выделены лишь в 1933 г., и антигенно они были отличны от вирусов гриппа свиней 1930 г. (и вирусов пандемического гриппа 1918 г.), т.к. они несли антигенно отличный HA. Суммарно эта информация представлена на рисунке 1.6.

Генетический анализ всех восьми сегментов генома вирусов гриппа A(H1N1) в период с 1918 по 2006 г показал, что их паттерны эволюции сходны с течением времени, что позволяет сделать вывод о том, что за этот период времени эти вирусы не приобретали новых генетических сегментов от птиц или других источников. И хотя общая тенденция эволюции вирусов гриппа H1N1 после пандемии 1918 г. (Morens D.M. et al., 2009) может быть описана как линейная, определяемая антигенным дрейфом, заметим, что на протяжении этого периода отмечены случаи внутритиповой реассортации среди вирусов, относящихся к различным антигенным и генетическим ветвям.

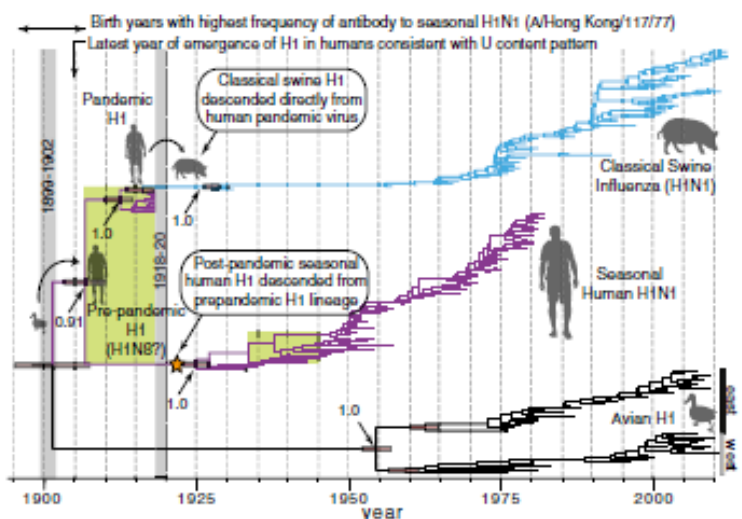


Рисунок 1.6. Происхождение вирусов 1918г, вирусов гриппа свиней и вирусов сезонного гриппа 1922-1957 г. Звездочкой отмечена реассортация «раннего» вируса H1N8 человека с вирусом пандемического гриппа 1918 г., что привело к возникновению линии постпандемических вирусов H1N1 (по работе Worobei M. et al., 2014).

Так, в 1947 г сезонная вакцинация против гриппа оказалась неэффективной, хотя вирусы, циркулировавшие в этом сезоне, по-прежнему относились к подтипу H1N1. Как будет установлено позднее, эпидемию 1947-1948 гг. вызвал реассортантный штамм H1N1, который имел измененный HA с заменами во всех пяти антигенных областях (Kilbourne E.D. et al., 2002). Эта реассортация была внутритиповой, т.е. произошла между штаммами H1N1 1943-1946 гг циркуляции и антигенно отличными от них вирусами H1N1 человека, циркулировавшими в популяции. При этом NA штамма 1947 осталась неизменной и была подобно таковой более ранних штаммов. Подобный же тип реассортации был зарегистрирован и для штаммов 1950-1951 гг. Заболеваемость в этот сезон в Великобритании и в Канаде превысила значения, зарегистрированные впоследствии для пандемий 1957 и 1968 гг (Viboud C. et al., 2006). Однако в 1957 вирусы подтипа H1N1 были вытеснены из циркуляции новым пандемическим штаммом H2N2, впоследствии вытесненным H3N2. Были ли эти вирусы вытеснены из человеческой популяции до конца или же сохранялись в ней на протяжении двадцатилетнего периода, не ясно до сих пор. В 1974 г. впервые был выделен вирус гриппа свиней подтипа H1N1 от человека, антигенно родственный «классическому» гриппу свиней. А в 1976 г. в Форте Дикс произошла вспышка гриппоподобного заболевания, этиологическим агентом которого оказался вирус гриппа H1N1 свиного происхождения. Всего год спустя произошел «русский грипп», который ознаменовал возвращение в циркуляцию вирусов H1N1. Антигенно вирусы 1977 года были близки с изолятами 1950 гг. (Zimmer S.M., Burke D.S., 2009). Эти данные косвенно свидетельствуют о том, что вирусы 1950х гг. сохранялись в популяции на протяжении всего периода отсутствия активной циркуляции H1N1. Однако есть и противоположное мнение о том, что такое антигенное родство со «старыми» вирусами указывает на лабораторные источники возвращения H1N1 в циркуляцию (Kendal A.P. et al., 1978). В 1977 г. произошло и еще одно важное событие с точки зрения эпидемиологии и эволюции вирусов гриппа. Все предыдущие пандемии приводили к вытеснению штамма, предшествующего пандемическому из циркуляции. Однако с 1977 устойчиво

наблюдается одновременная циркуляция вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2). Отметим, что в пандемический период 2009-2010 гг. отмечалась лишь циркуляция вирусов А(Н1N1)pdm09, однако после окончания пандемии вирусы гриппа А(Н3N2) вернулись в циркуляцию.

В 1976 г. импорт свиней из США в Италию привел к тому, что впервые на Европейский континент попал вирус «классического» гриппа свиней (Nardelli L. et al., 1978). Распространение данного вируса среди восприимчивых животных произошло молниеносно, а в 1979 г. в Европе был зарегистрирован новый подтип вирусов А(Н1N1) у свиней, имеющих происхождение от диких уток. Этот новый штамм вытеснил вирус «классического гриппа» из циркуляции, что было отмечено не только в популяции европейских свиней, но также и в Китае (имеющем наибольшую популяцию свиней в мире). А в 1998 г. в США от свиней были впервые выделены тройные реассортанты, у которых 5 генов были сохранены от вируса «классического гриппа» свиней, а сегменты PA и PB2 были родственны вирусам гриппа птиц, в то время как сегмент PB1 вел свое происхождение от вирусов гриппа человека подтипа А(Н3N2). Вскоре после этого момента были зарегистрированы первые заболевания людей такими тройными реассортантными штаммами свиней, которые регистрировались на территории Канады и США на протяжении 10-летнего периода с 1999 по 2009 г, однако они всегда носили спорадический характер и были связаны с тесным контактом заболевших со свиньями (Zimmer S.M., Burke D.S., 2009). Считается, что эволюция вирусов гриппа свиней идет медленнее, чем вирусов гриппа человека, и это подтверждают многочисленные факты. Но для тройных реассортантных штаммов, возникших в 1998 г. в США, это оказалось не так. Спустя всего 10 лет циркуляции они вновь подверглись реассортации, на этот раз с вирусами гриппа свиней евразийской линии А(Н1N1), возникшей в 1979 г. Результатом этой реассортации стало появление нового тройного реассортанта, который в 2009 г. стал известен как вирус пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09.

Недавний углубленный филогенетический анализ вирусов гриппа А(Н1N1), выделенных в период с 1918 по 2006, позволил выявить интересные особенности эволюции вирусов «сезонного» гриппа А(Н1N1). Вирусы гриппа данного подтипа менее подвержены процессу антигенного дрейфа, а потому их эволюция, в отличие от вирусов гриппа А(Н3N2), протекает медленнее и не сопровождается выраженными антигенными и генетическими отличиями, возникающими за короткий срок эпидемического сезона. Действительно, изменения в составе сезонных вакцин для вирусов гриппа А(Н1N1) в период с 2000 по 2009 гг. были введены всего два раза (смена А/Новая Каледония/20/1999→А/Соломоновы Острова/3/2006→А/Брисбен/59/2007), в то время как для вирусов гриппа А(Н3N2) эта смена произошла за указанный период 5 раз. Американские исследователи на большом фактическом материале установили, что помимо антигенного дрейфа, в изменчивости вирусов А(Н1N1) значимую роль имеет внутритиповая реассортация, которая для разных сегментов генома выражена по-разному (Nelson M.I. et al., 2008). На рисунке 1.7 представлены суммарные данные, полученные для вирусов А(Н1N1) 1918-2006 гг. выделения. Так, из рисунка следует, что вирусы 1947 г. произошли в результате реассортации вирусов 1943-1945 гг. (сегменты PB1, NA, M) и другой минорной группы вирусов, давшей сегменты PB2, PA, HA, NP, NS. Подобная же ситуация отмечена и для вирусов 1951 г. Еще одно важное наблюдение можно сделать, проанализировав дину ветвей филогенетического дерева, соединяющих различные секции. Видно, что наиболее короткая ветвь соединяет секции IV (изоляты 1950-хх) и V (ранние изоляты 1977-1978). Это свидетельствует о самых незначительных изменениях данных вирусов за двадцатилетний период, что является еще одним подтверждением того, что штамм, вернувшийся в 1977 г., был лабораторным изолятом, а не природно-сохранившимся вирусом. В общем, можно отметить, что большинство клейдов (А, В, С, H, I, J) расположены на филогенетическом дереве на единственной ветви, а значит не являются реассортантными. В то же время клейды D, E, F, и G одновременно занимают различные ветви, что свидетельствует о реассортации. Так, клейд D присутствует в секции II (для сегментов PB1, NA,

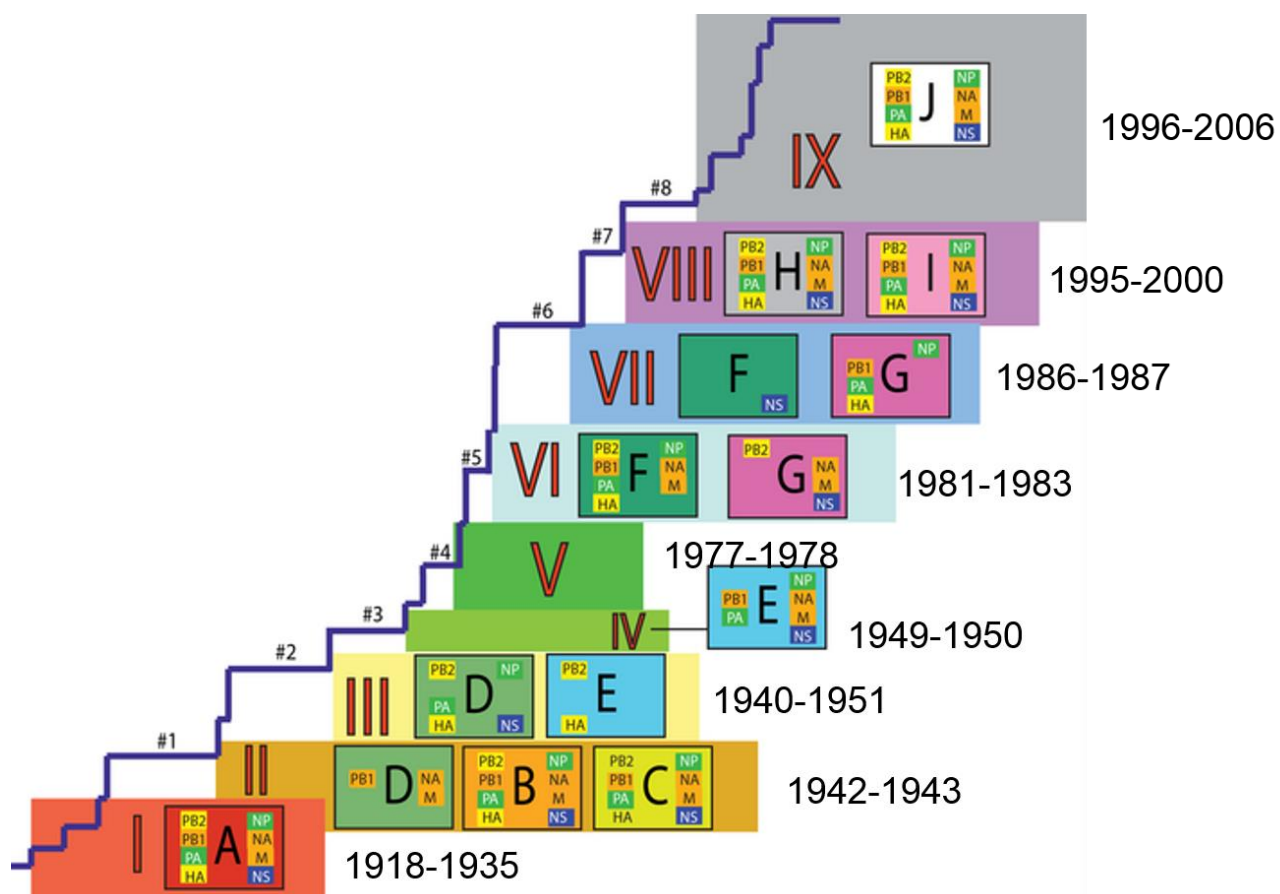


Рисунок 1.7. Схематическая репрезентация филогенетических паттернов восьми сегментов генома вирусов гриппа A(H1N1), циркулировавших с 1918 по 2006 гг. Римскими числами отмечены секции вирусов, латинскими буквами – кланды. Внутри кландов указаны соответствующие геномные сегменты, раскрашенные соответственно своему эволюционному паттерну: желтый – PB2 и HA; оранжевый – PB1, NA, M; зеленый – NP и PA; фиолетовый – NS. (по материалам статьи Nelson M.I. et al., 2008).

М) вместе с кландами В и С, а в секции III (для сегментов PB2, PA, HA, NP, NS) формирует или отдельную секцию, или вместе с кландом Е (сегменты PA, NP, NS). Все это свидетельствует что, во-первых, в 1940-е гг. циркулировало как минимум 3 антигенно отличных ветви вирусов A(H1N1), а во-вторых, об активной реассортации вирусов из кланда D с вирусами из других кландов, которые теперь уже не всегда можно установить. В целом, филогенетический анализ полногеномно-секвенированных изолятов позволил выявить 4 эволюционных паттерна для вирусов гриппа A(H1N1). Для сегментов PB2 и HA установлена линейная эволюция, с единственным событием реассортации с участием кланда D. Для NA, M и PB1 характерен второй паттерн с реассортацией в кланде Е. Третий отмечен для сегментов PA и NP с двумя реассортациями с участием кландов D и Е.

Четвертый паттерн характерен для сегмента NS, для которого зарегистрировано как минимум три акта реассортации с участием клайдов D, E, F, G.

Подводя итог, можно сказать что для вирусов сезонного гриппа А(Н1N1) характерно два основных механизма эволюционной изменчивости: антигенный дрейф с постепенным накоплением антигенно значимых мутаций и внутритиповая реассортация, регистрируемая для всех сегментов генома, и наименее характерная для НА.

1.3.3.2. Изменчивость гемагглютини́на вирусов гриппа А(Н1N1) 1918-2009 гг. выделения и роль позитивной селекции.

Кристаллическая структура НА для субъединицы НА1 установлена для вируса А/Пуэрто Рико/8/34; с использованием моноклональных антител определены основные антигенные сайты. Для НА подтипа Н1 выделяют пять антигенных сайтов (см. рис. 1.8), основным из которых является антигенный сайт Sb, который расположен на верхушке молекулы НА. В работе Стрей и Питтман были применены новые методы оценки антигенных сайтов на основе биофизических характеристик молекул НА (Stray S.J., Pittman L.B., 2012). В результате авторы предложили дополнительный антигенный сайт для молекулы НА1, названный Н1с. Стоит отметить, что экспериментально данный антигенный сайт не был подтвержден.

Установлено, что за связывание с рецепторами ответственны АК, расположенные в позициях 134, 184, 186, 190, 221, 222, 224 (нумерация по А/Н1N1/Brisbane/59/07) (Rogers G.N., DeSouza B.L., 1989). Среди них ведущая

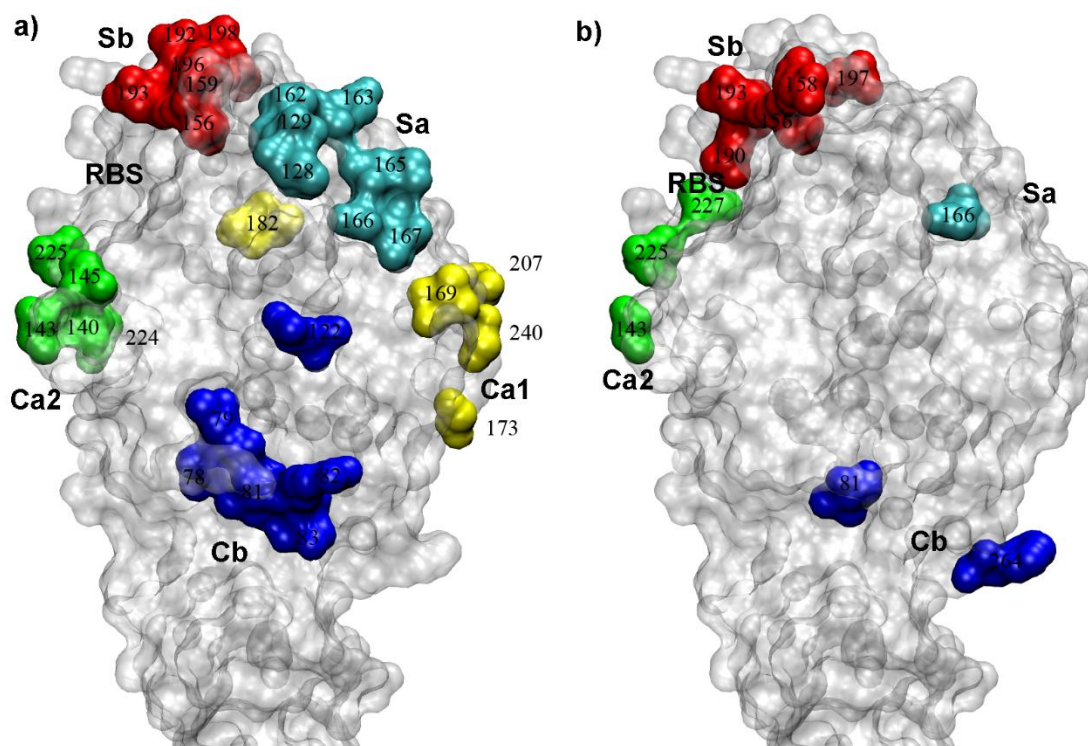


Рисунок. 1.8. Антигенные сайты в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа А/Пуэрто Рико/8/34. Цветом выделены и обозначены пять антигенных сайтов: Sa – ярко голубой, Sb – красный, Ca₁ – желтый, Ca₂ – зеленый, Cb – синий. Использована нумерация по НЗ (по работе Shen J. et al., 2009). а, b – разные проекции мономера молекулы HA

роль в определении рецепторной специфичности принадлежит аминокислотным позициям 186 и 221: комбинация D186/ D221 ответственна за связывание с α -2,6 рецепторами человеческого типа, D186/G221 приводит к связыванию как с α -2,3, так и α -2,6 рецепторами у вирусов гриппа свиней А(H1N1), а вариант E186/G221 определяет рецепторную специфичность к рецепторам типа α -2,3 у птиц (Tumpey T. et al., 2007; Srinivasan A et al., 2008; Stevens J. et al., 2006). Описаны также мутации, возникающие при адаптации штаммов к росту на куриных эмбрионах. Основные изменения зарегистрированы для позиций 134,140,159,185,186, 221 и 222 (Robertson J.S. et al., 1987; Xu X. et al, 1993; Gambaryan A.S. et al., 1999). Исследования, посвященные изменчивости молекулы HA у вирусов подтипа А(H1N1), показали следующее. Ранние изоляты 1933-1979 гг. подвергались действию позитивной селекции в области антигенных сайтов Cb (73) и Ca2 (221,223), однако изменения для сайта Ca2 связаны с изоляцией и размножением

этих вирусов на куриных эмбрионах. Вирусы 1949-1957 имеют сайты позитивной селекции в антигенных областях Ca2 (139), Sa (162), Cb (260). Поскольку все они расположены вдали от рецептор-связывающего сайта, предполагается, что действие позитивной селекции связано с избеганием иммунного ответа (Shen J. et al., 2009). Особый интерес представляет тот факт, что штаммы 1947-1957 года демонстрировали вариабельность по позиции 186, и около 25% всех проанализированных вирусов имели отличную от аспартата аминокислоту. При этом вирусы конца 70хх гг. в данной позиции имеют абсолютно консервативный остаток аспарагиновой кислоты, инвариабельный для большинства проанализированных образцов, что говорит о том, что давление отбора изменилось. Для большинства изолятов 1979-2006 гг выявлено отсутствие сайтов позитивной селекции, что согласуется с данными других исследователей. При этом, для штаммов 2006-2008 гг. выделения наблюдается выраженная позитивная селекция, что подтверждает данные антигенного анализа о необходимости смены вакцинного штамма в 2007 г. Под действием позитивной селекции вновь находился аминокислотный остаток в 186 положении, определяющий рецепторную специфичность вирусов А(Н1N1). Отметим, что анализ сайтов позитивной селекции для вирусов гриппа свиней А(Н1N1) в период с 1990 по 2009 гг. не выявил ни одного сайта в НА, находящегося под действием позитивной селекции (Shen J. et al., 2009).

1.3.3.3. Эволюционная изменчивость НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.

Филогенетический анализ по времени возникновения наиболее близкого общего предка (ТМРСА – time of most recent common ancestor) указывает на то, что штаммы пандемического гриппа 2009 г. возникли в конце 2007 – начале 2008 гг. (Abdussamad J., Aris-Brosou S., 2011). Кристаллизация молекулы НА штамма А/Дарвин/2001/2009 позволила сравнить структуру НА для вирусов пандемического гриппа 2009 г., вирусов сезонного гриппа и вирусов гриппа птиц подтипа А(Н5N1) (Yang H. et al., 2010). Общая топология молекулы для вирусов А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и А(Н5N1) очень схожа. Отмечено также сходство и с НА

вирусов 1918 г. Антигенные сайты в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 совпадают с таковыми для вирусов гриппа А(Н1N1). Стоит отметить, что антигенный сайт Са находится в непосредственной близости к олигосахариду, взаимодействующему с аспарагином в 87 положении, а потому, возможно, замаскирован от узнавания антителами.

Какие же изменения произошли в молекуле НА пандемических вирусов за период их циркуляции среди населения? Среди первых, выделенных и охарактеризованных антигенно и генетически, были вирусы А/Калифорния/04/09 и А/Калифорния/07/09 (Garten R. et al., 2009). Относительно них и сравнивались все последующие изоляты. Одним из наиболее ранних изменений в НА стала мутация серина на треонин в 203 положении, которая впоследствии закрепилась у всех вирусов пандемического гриппа. Предполагают, что эта замена ведет к увеличению стабильности молекулы НА (Yang H. et al., 2010). В пандемический сезон 2009-2010 гг. большинство изолятов по миру были антигенно однородны и реагировали с антисывороткой к эталонному штамму А/Калифорния/07/09 до 1-1/2 гомологичного титра. Этот факт свидетельствует о том, что никаких принципиальных изменений в антигенно-значимых областях НА не произошло. Однако было зафиксировано небольшое количество вирусов, которые несли замены в позициях 154-156, расположенных в пределах антигенно-значимой области Sb. Такие вирусы, как например А/Львов/№6/2009, проявляли антигенные отличия от эталонных штаммов, однако все они были не более 1/4-1/8 гомологичного титра. Более того, стоит отметить, что широкого распространения вирусов, несущих замены в этой области не последовало (WHO NIMR 2009, 2010). В следующие эпидемические сезоны генетическое разнообразие вирусов А(Н1N1)pdm09 возрастало, однако антигенно значимых изменений зарегистрировано не было. Суммарно генетическая вариабельность НА в разные сезоны представлена на рисунке 9.

Стоит отметить, что Сотрудничающие центры ВОЗ по гриппу регулярно регистрируют отдельные штаммы вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, имеющие

пониженные титры в РТГА в реакции с антисыворотками к эталонным штаммам. Доля таких вирусов в различные сезоны отличалась. Если в начале пандемии она была невелика, то к февралю 2011 в отдельных странах она достигала 15% (Иран, Мадагаскар, Франция, Швеция, Англия, Египет), однако большинство проанализированных вирусов имели замены в позициях 154-156, и не приобрели других антигенно важных мутаций. Доля таких вирусов в последующие сезоны не возрастала, а иногда и снижалась (WHO NIMR, 2009, 2010, 2011, 2012). Среди дополнительных антигенно-значимых замен в 2013 г. были зафиксированы A48D, G225A, K142E, K211R. Большинство из них расположено в антигенных сайтах Ca1 и Ca2, что позволяет сделать вывод о том, что олигосахариды в 87 положении по аспарагину не маскируют данные антигенные сайты от узнавания антителами, либо же в данной позиции не происходит самого гликозилирования.

Результаты, полученные с помощью компьютерной симуляции, позволили проанализировать роль некоторых замен в HA, возникших в ходе эволюции HA вирусов A(H1N1)pdm09. Так, к 2010-2011 гг. в мире были зарегистрированы вирусы, несущие замены S143G и S185T (см. рис. 1.9). Позиция 143 расположена в антигенном сайте Ca2, а аминокислота 185 – в антигенном сайте Sb. Компьютерная симуляция показала, что ни одна из этих замен не влияет на рецептор-связывающие свойства, а антигенный анализ таких вирусов выявил их однородность с эталонными штаммами (Jimenez-Alberto A. et al., 2013; WHO, 2011). Еще одна мутация, зарегистрированная среди изолятов A(H1N1)pdm09 в 2010-2012 гг. – A134T – также расположена в области рецептор-связывающего сайта, однако по данным компьютерного анализа и она никак не влияет на рецептор-связывающие характеристики вирусов. Интересен анализ более поздней мутации E374K, расположенной в HA2 субъединице HA. По данным авторов (Jimenez-Alberto A. et al., 2013) эта замена приводит к дестабилизации молекулы HA, что увеличивает рН среды, необходимой его активации. Такие характеристики связаны с повышенной вирулентностью вирусов гриппа птиц (Dubois R.M. et al., 2011). В этой связи предполагается, что вирусы, несущие E374K, обладают повышенной способностью

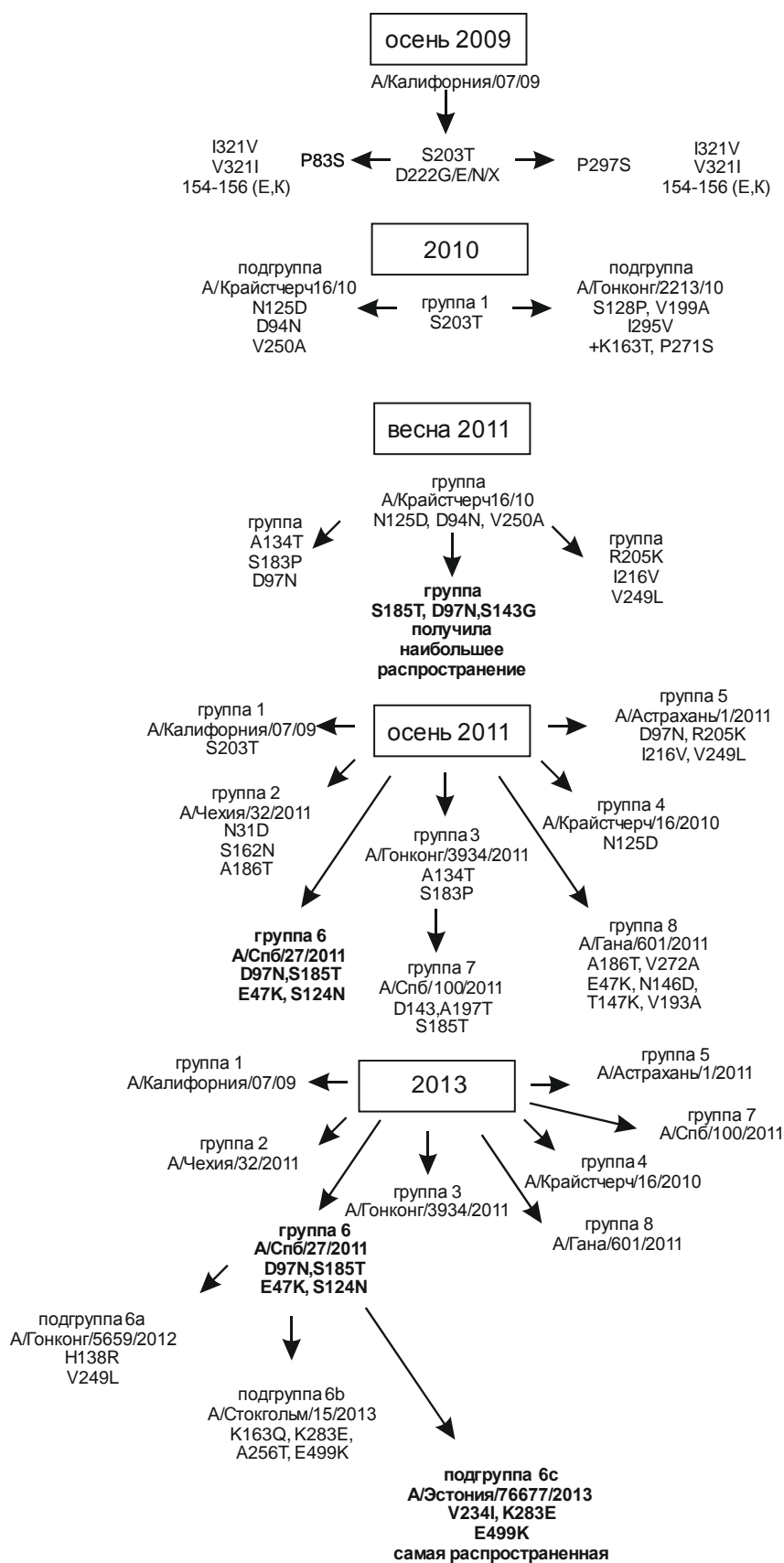


Рисунок 1.9. Основные генетические группы вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 по данным СЦ ВОЗ по гриппу. Группы, выделенные жирным шрифтом получили наибольшее распространение в указанный сезон.

инфицировать клетки-мишени. Однако экспериментального подтверждения этой гипотезы пока нет.

Среди всех аминокислотных мутаций, выявленных у вирусов пандемического гриппа 2009 г. особая роль принадлежит замене D222G и ее вариациям. После анализа тяжелых и летальных случаев было установлено, что НА возбудителей гриппозной инфекции часто обладает заменой в 222 положении. При этом в пробе от больного или секционном материале можно обнаружить не только один вариант вируса (исходный или мутантный), но и несколько субпопуляций, состоящих как из консенсусных, так и мутантных по 222 положению вирусов (Львов Д.К. и др., 2010а; 2010в; 2012; 2013). Такие данные были получены многими исследователями уже к концу 2009 г (Kilander A. et al., 2010; Glinsky G.V., 2010; Melidou A. et al., 2010; Xu L., 2010; Yasugi M. et al., 2012; Wedde M. et al., 2013). Анализ биологической роли этой мутации был проведен с использованием мышей и хорьков. Работы, выполненные на этих модельных животных, позволили установить, что данная мутация не влияет ни на трансмиссивность вируса, ни на его патогенность для экспериментальных животных, ни на клеточный тропизм вируса (Belser J. et al., 2011; Chutinimitkul S. et al., 2010). Однако ярко выраженным отличием таких вирусов стала смена их рецепторной специфичности, установленная с использованием ре-сиалированных эритроцитов индейки и олигосахаридного микрочипа. Вирусы, несущие мутацию D222G, как и вирусы дикого типа, способны связывать эритроциты индейки, но если с них удалить все сиаловые кислоты, а затем с помощью α -2,3 или α -2,6 –сиалилтрансфераз восстановить эти рецепторы на поверхности эритроцитов, то окажется, что вирус дикого типа будет связываться с эритроцитами, несущими α -2,6 тип связи, в то время как вариант D222G не будет способен к агглютинации ни эритроцитов с восстановленными α -2,3 рецепторами, ни с α -2,6 (Chutinimitkul S. et al., 2010). Т.о. эритроциты индейки содержат сиаловые кислоты более сложного состава, которые не удастся восстановить за счет сиалилтрансфераз, но именно они определяют способность мутантных вирусов D222G связываться с рецепторами на поверхности клеток. Использование микрочипа показало незначительное снижение

способности связываться с α -2,6 олигосахаридами, и принципиальное увеличение тропизма к олигосахаридам с α -2,3 типом связей. Компьютерное моделирование, проведенное китайскими исследователями, выявило, что размер рецептор-связывающего кармана у вирусов A(H1N1)pdm09 меньше, чем у других вирусов гриппа А (Tse H. et al., 2011). Это позволяет, с одной стороны более тесно контактировать с рецептором, с другой стороны может приводить к стерическому стрессу при связывании с сиаловой кислотой. Замена D222G влияет на полярность аминокислот в позициях 130, 142, 219, составляющих рецептор-связывающее окружение (т.н. «лизиновый забор»), приводя к его удлинению. Авторы предполагают, что для стабилизации рецептор-связывающего кармана необходимо смещение высоко консервативного остатка Q223, находящегося в непосредственной близости от D222.

Замена Q223R действительно была обнаружена у многих штаммов вирусов A(H1N1)pdm09. Однако причины ее возникновения связаны с системой выделения и накопления вируса. В большинстве случаев обнаружение Q223R было связано с выделением и пассированием вирусов на куриных эмбрионах (Yasugi M., 2012; WHO NIMR, 2011). Более того, иногда эта мутация сопровождалась и заменой D222G. С учетом того, что клетки куриного эмбриона несут рецепторы с преобладанием α -2,3 типа связей, эти мутации отражают приспособление вирусов к эффективному связыванию с рецепторами на поверхности клеток.

Анализ позитивной селекции, проведенный для вирусов A(H1N1)pdm09, позволил выявить позиции, находящиеся под давлением отбора и сравнить их с таковыми для вирусов сезонного гриппа, а также вирусов гриппа свиней. Как уже упоминалось ранее, для вирусов гриппа свиней не удалось выявить сайтов позитивной селекции, однако использование разнообразных подходов для анализа позитивной селекции указывает на то, что возможно такими сайтами могут быть позиции 138 и 399 (Li W. et al., 2011). Вирусы сезонного гриппа и вирусы пандемического гриппа имеют несколько общих сайтов, подвергающихся действию позитивной селекции. Это позиции 186, 222 в HA1 и 451 в HA2 (Li W. et al., 2011). Сайты, расположенные в HA1, как упоминалось выше, ответственны за

рецепторную специфичность, в то время как биологическая роль замены в позиции 451 не определена. Помимо этого, выявлены и позиции, специфичные для НА вирусов пандемического гриппа 2009 г., такие как 197, 203, 205, 223 и 261, которые, по-видимому, связаны с избеганием иммунного ответа. Так, мутация S203T - одна из самых ранних, среди зафиксированных для вирусов A(H1N1)pdm09. Она закрепились у всех изолятов, выделенных после лета 2009 г. Однако в конце 2013 г. зафиксировано появление штаммов, содержащих реверсию T203S, формирующих пока лишь минорную группу (WHO NIMR, 2013). Мутации в 197 и 205 положениях были зафиксированы в 2011 г., и впоследствии вирусы, обладающие заменами в этих положениях, сформировали разные генетические группы (5 и 7, см. рис. 9). Искусственная селекция в положении 223 связана с адаптацией штаммов к росту на куриных эмбрионах и не может рассматриваться как произошедшая в результате естественного давления отбора, в то время как изменения в позиции 261, наоборот, напрямую связаны с избеганием иммунного ответа, т.к. данный аминокислотный остаток расположен в антигенном сайте Сb (Li W. et al., 2011).

1.3.3.4. Биологические свойства и эволюционная изменчивость НА вирусов гриппа A(H1N1) и A(H1N1)pdm09.

НА вирусов гриппа А представлена тетрамерами из четырех идентичных полипептидов. Установление кристаллической структуры для НА подтипов N1, N2, N4, N6, N8, N9 позволило доказать, что все они имеют сходную топологию и состоят из четырех основных доменов: короткого цитоплазматического домена, обладающего высокой степенью консерватизма среди разных подтипов НА, трансмембранного домена, стеблевого домена и глобулярного домена, несущего активный сайт фермента.

Длина стеблевого участка НА варьирует. Опубликованы исследования, свидетельствующие о том, что делеции в стеблевом участке НА подтипа N1 вирусов гриппа птиц связаны с адаптацией данных вирусов к домашней птице, однако окончательные механизмы остаются невыясненными (Munier S. et al., 2010).

По структуре каталитического домена все NA разделяют на две группы. Группа 1 включает N1, N4, N5 и N8, а вторая группа – остальные подтипы. Для NA первой группы характерна дополнительная полость рядом с активным сайтом фермента, которая создается за счет смещения 150 петли (AK 147-152) (Russell R.J. et al., 2006). При анализе конформации этой полости в комплексе с ингибиторами было установлено, что она может принимать открытую и закрытую конформацию, однако в случае вируса А/Калифорния/04/09 была отмечена только закрытая конформация при всех протестированных условиях.

Активный сайт фермента высоко консервативен по своей структуре. Согласно кристаллической структуре NA вируса А/Калифорния/04/09 он образован следующими аминокислотными остатками: R118, E119, D151, R152, R224, E276, R292, R371, Y406, которые участвуют в прямом контакте с субстратом (см. рис. 1.10). Аминокислотные позиции R156, W178, I222, E227, E277, N294 образуют и удерживают структуру активного сайта (нумерация по N1).

При изучении субстратной специфичности NA от разных подтипов вирусов гриппа было установлено, что NA обладают предпочтением к сиаловым кислотам с α -2,3 типом связи. Первичные исследования субстратной специфичности NA показали, что с течением времени вирусная NA приобретает большую активность к α -2,6 сиаловым кислотам, по сравнению с нейраминидазой ранних изолятов от человека (Kobasa D. et al., 1999; Wagner R. et al., 2002). Казалось, этот вывод свидетельствует о постепенной адаптации второго поверхностного белка вируса гриппа к человеческой популяции. Однако в дальнейшем было показано, что эти изменения носили минорный характер, и за последующие годы уровень активности в отношении α -2,3 и α -2,6 сиаловых кислот не изменился (Gulati U. et al., 2005). Вирусы гриппа человека подтипа N1 обладают предпочтительным связыванием α -2,3: α -2,6-сиаловых кислот в пропорции 5:1, а вирусы гриппа свиней и птиц демонстрируют абсолютное предпочтение к α -2,3: пропорции для таких изолятов составили 20:1 и 50:1 соответственно (Air G.M., 2012).

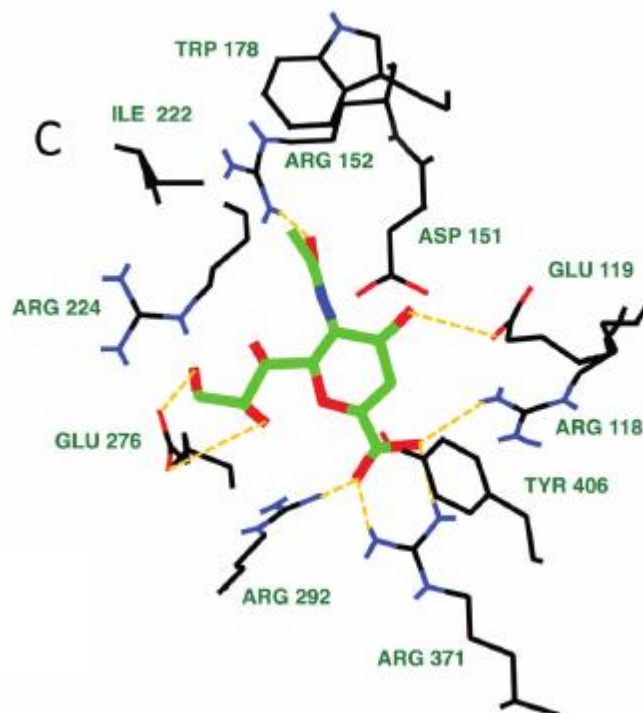


Рисунок 1.10. Аминокислотные остатки образующие активный сайт NA в комплексе с субстратом 2-деокси-2,3-дегидро-N-ацетилнейраминовой кислотой (по статье Air G.M., 2012).

При сравнении сиалидазной активности NA подтипа N1 вирусов гриппа птиц, свиней и вирусов сезонного и пандемического гриппа 2009 г. человека было установлено, что вирусы гриппа птиц наиболее активно гидролизовали α -2,3 связи сиаловых групп, по сравнению с вирусами гриппа свиней и человека (Gerlach T. et al., 2012). При этом вирусы сезонного гриппа A(H1N1), также как и вирусы «классического гриппа» свиней обладали выраженной активностью в отношении α -2,6 типа связи, что не отмечалось для вирусов гриппа птиц. Однако вирусы пандемического гриппа 2009 г. демонстрировали отличный от всех других протестированных вирусов профиль активности, поскольку были способны гидролизовать α -2,3 связи с той же эффективностью, что и вирусы гриппа птиц, а α -2,6 связи – также как вирусы «классического гриппа» свиней. Высокая активность NA вирусов A(H1N1)pdm09 была также подтверждена с использованием 7:1 рекомбинантных вирусов при исследовании элюции рекомбинантов, содержащих NA от разных вирусов. Рекомбинантные штаммы,

несущие N1 от вирусов гриппа свиней или A(H1N1)pdm09 элюировали в течение 2 ч, в то время как остальные штаммы не способны были к элюции даже спустя 24 ч после начала эксперимента. На основании данных, полученных в ходе исследований, авторы пришли к выводу о том, что NA вирусов A(H1N1)pdm09 более близка по своим биологическим свойствам к NA вирусов гриппа свиней, чем к вирусам гриппа птиц или людей.

Антигенные свойства NA вирусов гриппа, как и ее изменчивость, изучены слабее, чем HA. Это связано со многими факторами. Антитела, вырабатываемые к NA, не являются нейтрализующими, т.е. не блокируют прикрепление вирусных частиц к поверхности клеток-мишеней. При отборе мутантов с помощью моноклональных антител селекция успешна только в том случае, если такие антитела блокируют ферментативную активность NA, а потому большинство АК мутаций, зарегистрированных в NA различных подтипов связаны с изменениями/нарушениями в активном сайте фермента. Считается, что антительный ответ в отношении вирусной NA выражен слабее по сравнению с таковым для HA, т.к. количественно нейраминидаза представлена на поверхности вириона в меньшей степени, чем HA. И все же антинейраминидазные антитела способны обеспечивать защиту экспериментальных животных от инфекции (Webster R. et al., 1988). На основании экспериментальных данных и анализа изменчивости природных изолятов вирусов гриппа, выявлены следующие антигенно-значимые аминокислотные позиции и области: 150-153, 197-199, 220-221, 253, 328-336, 339-347, 367-370, 400-403, 431-434 (Colman P. et al., 1983; Air G.M., 2012). Интересен и тот факт, что если сравнить количество АК замен за десятилетний период в HA и NA вирусов гриппа человека, окажется, что они примерно равны; а для вирусов подтипа A(H3N2) этот дрейф для NA выражен даже сильнее, чем для HA (Air G.M., 2012). Это наблюдение позволяет предположить, что процесс антигенного дрейфа протекает в отношении вирусной NA с такой же интенсивностью, как и для HA.

При анализе изменчивости НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 было установлено, что наиболее ранние изменения произошли в позициях 106 (V106I) и 248 (N248D). По данным СЦ ВОЗ эти мутации всегда сопровождались заменой S203T в молекуле НА (WHO NIMR, 2009). Некоторые авторы связывали эти мутации с более тяжелыми случаями заболевания гриппом, однако впоследствии такой вывод не подтвердился (Tse H. et al., 2011). Отметим, что все изоляты А(Н1N1)pdm09, выделенные после 2009 г. несли V106I и N248D. В следующем сезоне 2010-2011 гг. были зарегистрированы изменения в позиции 286 (G286S), а также группы вирусов, несущие мутации в позициях 365 и 386 или в положениях 15 и 189 (WHO NIMR, 2010). Ни одна из этих замен не относилась к антигенно-значимым областям в НА, также, как и мутации V264I, N397K, S442I, I359V зарегистрированные в 2011 г. для кластера вирусов, выделенных в Франции, Латвии, Испании и Швеции. К концу 2011 г. генетическое разнообразие НА вирусов А(Н1N1)pdm09 было велико, и были выделены как минимум 8 генетических групп, в то время как НА дрейф не привел к подобной же ситуации для НА. Соотнесение генетических групп по НА и NA позволило установить, что вирусы, относящиеся к 3 группе по НА несут NA с характерными заменами Q313R, V394I, в то время как основные по распространенности группы НА 5,6 и 7 обладают схожей по последовательности NA с заменами N241I и N369K. При этом, N369K – одна из немногих мутаций, затрагивающая антигенный сайт 367-370 в структуре НА. Возможно, распространение NA такого АК состава среди наиболее выраженных групп по НА говорит о селективном преимуществе подобных штаммов А(Н1N1)pdm09. Помимо уже отмеченных, также зарегистрированы варианты с заменами R220K (антигенный сайт 220-221), I389K, I46T, I467V (WHO NIMR, 2012,2013).

Отдельный аспект, который привлекает внимание при анализе изменчивости НА, это появление и распространение мутаций, обеспечивающих резистентность к ингибиторам НА. Для вирусов А(Н1N1)pdm09 это мутация Н275Y, которая была зафиксирована вскоре после появления вирусов пандемического гриппа 2009 г.

Стоит особо отметить, что вирусы сезонного гриппа A(H1N1) в последние годы циркуляции демонстрировали высокий уровень устойчивости к озельтамивиру (WHO NIMR, 2007,2008), и потому после детекции устойчивых вариантов H275Y среди штаммов пандемического гриппа 2009 г. возникали опасения о быстром распространении устойчивости к ингибиторам NA в вирусной популяции. Однако этого не произошло. Детекция H275Y происходила во все сезоны циркуляции штаммов A(H1N1)pdm09, однако увеличения доли устойчивых мутантов не зафиксировано. Помимо H275Y отмечены также другие мутации, обеспечивающие резистентный фенотип к ингибиторам нейраминидазы: N295S (озельтамивир), I222R (занамибир) – встречающиеся реже, чем H275Y (Quiliano M. et al., 2013).

Исследования сайтов позитивной селекции показали, что давление отбора на NA выражено в значительной степени слабее, чем на HA. Возможно, это связано с малым сроком циркуляции вирусов в человеческой популяции. Так, при анализе сайтов, подверженных позитивной селекции, для вирусов A(H1N1)pdm09 были выявлены только позиции 35 и 453, в то время как для вирусов A(H1N1) таких позиций было 6. Стоит отметить, что для вирусов «классического гриппа» свиней A(H1N1) таких сайтов было выявлено от 3 до 7, в то время как для вирусов гриппа свиней евразийской линии была выявлена только одна позиция (Li W. et al., 2011). Эти результаты свидетельствуют о том, что для выявления позитивной селекции в NA существующими методами биоинформатики, необходима длительная циркуляция вирусов в популяции восприимчивых хозяев для «накопления» генетического разнообразия. Так, вирусы «классического гриппа» свиней, как и вирусы сезонного гриппа человека обладают длительной историей циркуляции, в то время как вирусы евразийской линии гриппа свиней циркулируют всего около 30 лет, а вирусы A(H1N1)pdm09 – лишь шестой год.

Биологическое значение выявленных сайтов 35 и 453 не ясно. Позиция 35 не может быть оценена с точки зрения биологической роли, т.к. она не входит в участок молекулы NA, который можно кристаллизовать. Роль АК остатка 453 пока не установлена.

1.4. Заключение

Как и в случае предыдущих пандемических событий, после прохождения пандемии 2009 г. вирус A(H1N1)pdm09 не ушел из циркуляции, а остался циркулировать среди населения в последующие эпидемические сезоны, и входит в состав современных трехвалентных (четыревалентных) противогриппозных вакцин в качестве одного из компонентов на протяжении уже 4 сезонов. Приход пандемического вируса A(H1N1)pdm09 полностью вытеснил другие вирусы гриппа А и В из циркуляции лишь на короткий срок, и уже в 2010 г наблюдалась циркуляция вирусов гриппа А(H3N2) и вирусов гриппа В, как в России, так и в мире. Однако с появлением A(H1N1)pdm09 полностью был вытеснен из циркуляции вирус сезонного гриппа А(H1N1). С 2010 г в мире не зарегистрировано случаев обнаружения или выделения вирусов сезонного гриппа А(H1N1), и на сегодняшний день неизвестно, сохранился ли этот вирус в человеческой популяции или же был полностью вытеснен глобальным господством A(H1N1)pdm09. Уход A(H1N1) из циркуляции в человеческой популяции на 20 лет уже отмечался в 1957 г., однако тогда он был замещен вирусами с другими антигенными формулами. Дальнейшая эволюция вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 покажет, станут ли они «приемниками» сезонных вирусов А(H1N1), или же наступит новая смена антигенных подтипов с приходом следующего этиологического агента новой пандемии. Для анализа антигенных и генетических изменений вирусов A(H1N1)pdm09 необходим постоянный мониторинг возбудителей, направленный как на выявление антигенно отличных вариантов, так и на отслеживание генетического разнообразия вирусов и возможных событий реассортации для своевременной детекции новых возбудителей в человеческой популяции.

Глава 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Вирусы.

В работе использовались следующие группы штаммов:

1. Эталонные и референс-штаммы вируса 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)
2. Эпидемические изоляты А(Н1N1)pdm09, выделенные из назофарингеальных мазков и секционных материалов в 2009-2013 гг
3. Вирусы гриппа птиц А(Н5N1): представлены в таблице 2.1

Таблица 2.1. Вирусы гриппа птиц А(Н5N1), использованные в работе.

Наименование вируса	Подтип	Источник получения
А/Мартын/Костанай/7/07	А(Н5N1) низкопатогенный	НИИ проблем биологической безопасности, Казахстан
А/Широконоска/ Костанай/58/07	А(Н5N1) низкопатогенный	
А/Скворец/ Костанай/233/07	А(Н5N1) низкопатогенный	
А/Скворец/ Костанай/236/07	А(Н5N1) низкопатогенный	
А/Золотистая Щурка/Чокпак/7а/07	А(Н5N1) низкопатогенный	
А/Курица/Курган/5/05	А(Н5N1) высокопатогенный	коллекция НИИ гриппа

Использованы также вирусы гриппа птиц подтипов А(Н2N2) и А(Н6N1) из коллекции НИИ гриппа.

Все работы со штаммами гриппа птиц проводились в боксах биобезопасности стандарта BSL-3 (WHO manual, 2002).

4. Вирусы гриппа свиней из коллекции музея вирусов гриппа, а также выделенные из назофарингеальных мазков в 2014 г.

Сыворотки. При идентификации изолятов использовались гипериммунные диагностические сыворотки крупного рогатого скота или овец, присылаемые ежегодно ВОЗ, а также гипериммунные кроличьи диагностические сыворотки, производства ООО «ППДП» НИИ гриппа и гипериммунные крысиные сыворотки, полученные к эпидемическим и референс-штаммам вируса гриппа разных лет выделения. Гипериммунные хорьковые антисыворотки были любезно предоставлены доктором Дж. МакКоли из сотрудничающего центра ВОЗ в Лондоне, Великобритания.

Куриные эмбрионы. Восстановление и накопление вирусов гриппа осуществлялись на 10-дневных куриных эмбрионах, поставляемых ООО «Племрепродуктор» (пос. Синявино, Ленинградская область, Россия).

Клеточные линии. В работе использованы следующие клеточные линии

- 1) перевиваемая клеточная линия почки собаки MDCK и ее генно-модифицированный вариант MDCK-Siat1. Получены из референс-лаборатории CDC, Атланта, США.
- 2) Перевиваемая клеточная линия карциномы ободочной кишки человека CaCo-2. Получена из американской коллекции клеточных культур ATCC. Любезно предоставлена для работы проф. А.Ю. Егоровым (Avir GreenHills, Австрия)
- 3) Первичная культура клеток почки новорожденного поросенка СП из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа
- 4) Диплоидные фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа
- 5) Перевиваемые клеточные линии человека из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа (см. табл.2.2)

Таблица 2.2. Клеточные линии человека из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа

Тип	Название	Происхождение
Монослойные культуры	A-549	Карцинома легкого, пневмоциты 2 порядка
	ECV-304	Клетки эндотелия
	T-98	Глиобластома
	A-172	Глиобластома
	RD	Рабдомиосаркома
	L-41	Моноцитарная лейкемия (дериват линии HeLa)
	Girardi Heart	Клетки предсердия

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). За исследуемый период было получено 4602 мазка из носа; в 1790 из них методом ОТ-ПЦР в реальном времени была обнаружена РНК гриппа А. Были также получены 309 секционных материала от 161 умершего, у которых в полимеразной цепной реакции прижизненно или постмортально была обнаружена РНК вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. Все материалы, где присутствие вирусной РНК было подтверждено в полимеразной цепной реакции, были использованы для выделения вирусов гриппа. Из данных материалов было выделено 559 вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.

Среды, буферные растворы, красители.

Поддерживающая среда для вирусологических опытов на культуре клеток MDCK. На 100 мл среды альфа-МЭМ вносят 2,6 мл сывороточного альбумина V фракции (Sigma, Германия), 1,6 мл буфера HEPES (Sigma, Германия), 100 мкл

раствора гентамицина для клеточных культур (Биолот, Санкт-Петербург), 100 мкл маточного раствора ТРСК-трипсина (2 мг/мл) (Sigma, Германия).

Фосфатно-солевой буфер (PBS). Готовили из таблеток производства «Биолот» (Санкт-Петербург), проверяя уровень pH=7,2.

Физиологический раствор. NaCl (Sigma, Германия) – 8,5 г/л, бидистиллированная вода – 1 л.

Трипановый синий (ПанЭко, Москва). Трипановый синий – 500 мг, физиологический раствор – 100 мл.

Аннексин V, меченный флуоресцеинизотиоцианатом, Hoechst 33342, йодид пропидия, 7-аминоактинимицин D, тетраметилпродаминовый эфир (Cayman Chemicals, США) были присланы в готовом виде и вносились в буфер для окрашивания строго по рекомендации производителя.

MES-буфер. 2,1 г MES (Sigma, Германия) растворяли в 100 мл дистиллированной воды, после чего доводили pH раствора до 6,5 концентрированным NaOH (Вектон, Санкт-Петербург). Буфер хранили при +8°C.

Стоп-реагент получали путем смешения 104,2 мл 96° этанола и 245,8 мл дистиллированной воды. Затем добавляли 3,04 г глицина (Sigma, Германия) и растворяли глицин помешиванием. Доводили pH полученного раствора до 10,7 концентрированным NaOH (Вектон, Санкт-Петербург) и доводили общий объем раствора дистиллированной водой до 400 мл. Стоп-реагент хранили при +8°C.

0,1M раствор CaCl₂ (Sigma, Германия) готовили путем растворения 1,47 г CaCl₂ в 100 мл дистиллированной воды. Раствор хранили при +8°C.

5mM раствор озельтамивира карбоксилата (тарtratной соли, Roche, Германия) готовили за счет растворения 4,83 г соли в 2,5 мл дистиллированной воды. Раствор хранили не более 1 месяца при +8°C.

5mM маточный раствор MUNANA (2-(4-(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты) получали при растворении 5 мг MUNANA (Sigma, Германия) в 2,24 мл дистиллированной воды. Полученный раствор разливали по 50 мкл в эппендорфы и хранили при -20°C.

2.2 Методы исследования

Восстановление лиофилизированных вирусов гриппа из коллекции на куриных эмбрионах (КЭ). Для восстановления лиофильно высушенных вирусов гриппа, в стеклянные ампулы с высушенным вирусом добавляли 1мл стерильного физиологического раствора, растворяли «таблетку» и переносили содержимое ампулы в стерильную пробирку. Готовили серию последовательных десятикратных разведений («цельное», 10^{-1} , 10^{-2}). Заражение производили на 10-ти дневных куриных эмбрионах. Поверхность яйца над воздушным пространством дезинфицировали спиртом и прожигали огнем. Затем в продезинфицированном участке скорлупы прожженным шилом проделывали отверстие, через которое стерильным шприцом в аллантоисную полость вводили 0,2 мл вирусосодержащего материала, отверстие заливали парафином. Зараженные эмбрионы инкубировали в термостате 48-72 часа при температуре 33-34°С для вирусов гриппа А человека и свиней, и 37°С для вирусов гриппа птиц А(Н5N1). После инкубации эмбрионы помещали на ночь в рефрижератор при +4°С, после чего производили вскрытие. Верхнюю часть яйца обрабатывали спиртом и прожигали, продезинфицированными ножницами вырезали отверстие 1,5 см в диаметре и стерильной пипеткой производили отбор хориоаллантоисной вирусосодержащей жидкости.

Индикацию вирусов гриппа осуществляли в реакции гемагглютинации (РГА) микрометодом. При отсутствии агглютинации эритроцитов проводили 2 дополнительных пассажа путем заражения эмбрионов аллантоисной жидкостью от предыдущего пассажа.

Накопление вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Заражение производили в аллантоисную полость 10-ти дневных куриных эмбрионов, методом, описанным выше. Эмбрионы инкубировали при 34-37°С в течение 48 часов. По истечении срока инкубации яйца охлаждали при температуре 4 °С в течение 12-18 часов и производили вскрытие. Контролем на наличие вируса служила реакция гемагглютинирующей активности (РГА). Вирусосодержащую жидкость разливали по микропробиркам по 1 мл, получая таким образом вирусный

сток, и хранили в замороженном виде на -70°C . Каждый вновь получаемый вирусный сток проверяли на инфекционную активность.

Культивирование клеток. Пересев перевиваемых клеточных линий осуществлялся на 7-8 сутки в среде альфа MEM с добавлением 2% фетальной сыворотки коров (ф.с.) в соотношении 1:3-1:5. Посевная концентрация составляла $2,5-5,0 \cdot 10^5$ кл/мл. Пересев первичных клеток СП и диплоидных ФЛЭЧ, а также перевиваемой линии CaCo-2 проводили на 7 сутки в среде альфа MEM с добавлением 5% ф.с. в соотношении 1:2-1:3. Генномодифицированную линию MDCK-Siat1 пересевали на 3 сутки в среде DMEM с добавлением 5% ф.с. и селективного антибиотика генетицина G418 (Sigma, Германия; 1 мг/мл среды) в соотношении 1:3. Все клеточные линии культивировали без антибиотиков. Питательные среды и сыворотки получали в фирме «БИОЛОТ» (Санкт-Петербург).

Выделение вирусов гриппа на культуре клеток MDCK, MDCK-Siat1 и CaCo-2 проводили по стандартной методике ВОЗ, приведенной в работе (WHO manual, 2011). Монослой CaCo-2 формировался медленнее, чем монослой MDCK и работу с CaCo-2 начинали на вторые сутки после полного формирования монослоя. Выделение на культуре клеток CaCo-2 проводили сходным образом, однако в поддерживающую среду не вносили трипсин. Учет результатов выделения проводили на 3 и 6 сутки после заражения по наличию цитопатического действия вируса и в РГА с эритроцитами человека. В случае отрицательного результата на 6 сутки проводили дополнительный «слепой» пассаж. Для каждой пробы проводили три последовательных пассажа.

Реакции гемагглютинирующей активности (РГА) проводили согласно методике, приведенной в методических рекомендациях (Соминина А.А. и др., 2006). В иммунологических планшетах с U-образным дном готовили последовательные двукратные разведения вируса в физиологическом растворе. После этого во все лунки вносили по 50 мкл взвеси 0,5% куриных эритроцитов или 0,75% взвеси эритроцитов человека 0 (I) группы крови. Реакцию ставили при комнатной температуре. По истечению 30 минут производили учет результатов реакции. Титром вируса считали то его наибольшее разведение, при котором еще

наблюдалась агглютинация эритроцитов, что соответствует одной агглютинирующей единице (АЕ).

Реакция торможения гемагглютинирующей активности (РТГА). РТГА основана на свойстве специфических антисывороток подавлять гемагглютинирующую активность вирусов. РТГА проводили согласно методике, рекомендованной ВОЗ (WHO manual, 2011). Обработку хорьковых и крысиных антисывороток для освобождения от неспецифических ингибиторов для РТГА осуществляли следующим образом: к 1 объему нативной сыворотки добавляли 3 объема рецептор-разрушающего энзима (RDE; Seika, Япония) и оставляли полученное разведение на 12 часов в термостате при 37°C. Далее доводили объем сыворотки до разведения 1:10 от начального объема и прогревали на водяной бане 30 минут при 56°C.

Гипериммунные крысиные антисыворотки получали путем 4-х кратной внутрибрюшинной иммунизации вирусосодержащей суспензией (полученной из аллантаической полости куриных эмбрионов или из супернатанта клеток MDCK, титр не менее 1:64) белых беспородных крыс массой 300 г с интервалом 3-4 дня. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными, утвержденными Минздравом РФ. Через 9-12 дней после последней иммунизации, проводили обескровливание животных под эфирным наркозом и получали иммунную антисыворотку. Для удаления неспецифических ингибиторов сыворотки обрабатывали RDE, как описано выше.

Построение антигенных карт проводили с использованием бесплатного программного обеспечения в режиме онлайн, расположенного на сайте <http://antigenic-cartography.org>. Метод впервые предложен (Smith D. et al., 2004) и более подробно описан в разделе «Собственных исследований».

Определение инфекционной активности вирусов гриппа на культуре клеток MDCK. Односуюточную культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных планшетах (Nunc, Дания), проверяли визуально в инвертированном микроскопе на целостность и сомкнутость монослоя. Далее готовили десятикратные вирусные

разведения из стока аллантоисной жидкости, на поддерживающей среде с добавлением трипсина в концентрации 2 мкг/мл (с 10^{-1} по 10^{-8}). Планшеты с монослоем клеток дважды отмывали средой, не содержащей сыворотки, после чего вносили вирусные разведения в соответствующие лунки планшета в объеме 50 мкл. Каждое вирусное разведение вносили в 10 лунок планшета. Контрольные лунки заполняли ростовой средой в равном объеме. Планшеты инкубировали 60 мин при 37°C в присутствии 5% CO_2 , после чего отмывали ростовой средой, для того, чтобы удалить несвязавшиеся с клетками вирусные частицы. Далее вносили во все лунки планшета с вирусными разведениями по 100 мкл поддерживающей среды. Контрольные лунки заполняли ростовой средой в том же объеме. Планшеты инкубировали 72 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Инфекционную активность в данной работе рассчитывали по методу, описанному в работе (Reed L., Muench H., 1938) и выражали в $\text{lgTЦИД}_{50}/\text{мл}$. Исходя из значений lgTЦИД_{50} в 1 мл вирусной суспензии высчитывали разведение вируса, для получения необходимой множественности инфекции (МИ).

$$\text{МИ} = (0,7 * \text{N} * \text{V}) / (\text{X} * \text{P}),$$

где N - $\text{lgTЦИД}_{50}/\text{мл}$, V – объем вносимой вирусной суспензии, X – количество клеток в опыте, P – фактор разведения исходной вирусной суспензии

Для всех клеточных культур рассчитывали МИ, исходя из значений $\text{lgTЦИД}_{50}/\text{мл}$, полученных для исследуемых вирусов на культуре клеток MDCK.

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). Моноклональные антитела к белку NP вирусов гриппа А любезно предоставлены Сорокиным Е.В. (лаб. биотехнологии диагностических препаратов, НИИ гриппа).

Определение индекса апоптоза. Апоптоз в клетках определяли по деградации ядерного хроматина, выявляемой при окрашивании красителем Hoechst-33258 (CalBioChem-Behring, кат. номер 382501, Германия). Для этого исследуемую культуру клеток рассеивали на пенициллиновые флаконы с вложенным покровным

стеклышком. Посевная концентрация клеток $2,5-5 \cdot 10^4$ клеток/мл. Выросшие клетки не должны образовывать сомкнутый монослой, т.к. необходимо, чтобы между клетками оставались свободные промежутки. Подготовленные флаконы с культурой клеток инфицировали вирусом гриппа (МИ=0,01-1) в присутствии или отсутствие противовирусных препаратов. В контрольные флаконы вносили питательную среду. Через 18-24 ч клетки обрабатывали фиксатором (раствором этанола с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3:1), удаляли супернатант из флаконов, доставали покровные стекла и проводили окончательную фиксацию, добавляя раствор фиксатора на покровное стекло на 15-20 мин. Избыток фиксатора удаляли фильтровальной бумагой и наслаивали рабочий раствор Hoechst-33258 (0,05 мкг/мл) на 15-20 мин, после чего избыток краски удаляли и промывали стекла дважды в дистиллированной воде. Просмотр стекол проводили в люминесцентном микроскопе с иммерсией (иммерсионное масло для иммунофлуоресценции). Окрашенные ядра клеток ярко светятся изумрудно-зеленым, при этом цитоплазма выглядит тускло-зеленой. Проводили подсчет нормальных ядер и деградировавших ядер с типичными признаками апоптотической гибели (сморщивание, фрагментация, изменение морфологии) в 25 полях зрения. Индекс апоптоза рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ИА} = (b/c) \cdot 100\%,$$

где ИА – индекс апоптоза, b – количество апоптотических клеток, c – общее количество клеток. Каждый опыт повторяли не менее 2 раз.

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

Определение нейраминидазной активности проводили по методике, рекомендованной ВОЗ и подробно приведенной в главе 2.к руководства (WHO

manual, 2011). Измерение нейраминидазной активности проводили в черных непрозрачных планшетах (Nunc, Дания) на планшетном ридере VarioScan (ThermoFisher Scientific, Германия) при следующих длинах волн: длина волны возбуждения – 360 нм, эмиссии – 460 нм. По результатам калибровочной кривой вычисляли значение активности фермента, выраженное в мкМ 4-метилумбеллиферола (флуоресцирующего продукта реакции) /мл*мин.

Выделение вирусной РНК. Вирусную РНК выделяли непосредственно из клинического материала (отделяемое из глубоких отделов носоглотки, гомогенизированных фрагментов тканей), или после культивирования из аллантаисной жидкости куриных эмбрионов или клеток почки собаки MDCK. Выделение проводили коммерческим набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

Обратную транскрипцию и амплификацию полного 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). Обратная транскрипция проводилась в течение 45 мин при 48 °С. Программа амплификации: 94 °С – 2 мин, 94 °С – 20 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин (30 циклов), 72 °С – 7 мин . Для амплификации использовали термоциклер C1000 (BioRad, США). Последовательности праймеров для обратной транскрипции и амплификации генома вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 приведены в приложении 2.

Анализ продуктов амплификации фрагментов генома вирусов гриппа А/H1N1pdm09 проводили гель-электрофорезом в 2%-ном агарозном геле в течение 60 мин при разности потенциалов 100 В и силе тока 70 мА. Рабочий буфер TBE с добавлением бромида этидия. В качестве маркера молекулярной массы использовался GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Детекция проводилась визуально в УФ свете ($\lambda=250$ нм). Фотосъемка осуществлялась системой для документации Kodak ImageStation 2000 (Kodak, США).

ДНК из агарозного геля выделяли коммерческим набором QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК после выделения из

агарозного геля определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo, США).

Секвенирование генов HA и NA. Секвенирование проводили методом Сэнгера с использованием коммерчески доступного набора реагентов ABI BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, США). Удлинение цепи осуществлялось Taq-полимеразой AmpliTaq FS, терминировалось флуоресцентно-мечеными дидезоксинуклеотидами (BigDye терминаторами). Секвенирование каждой последовательности проводили с прямого и обратного праймеров. Для секвенирования использовали праймеры m13F и m13R (см. табл. 2.3).

Таблица. 2.3. Праймеры для секвенирования фрагментов генома вирусов гриппа A(H1N1)pdm09

Праймер	Последовательность	Длина
m13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	18
m13R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	18

Состав реакционной смеси: ABI BigDye Terminator v3.1 – 0,5 мкл, BigDye Terminator Sequencing Buffer – 3,5 мкл, ДНК (25 нг/реакцию) – 5 мкл, праймер – 1 мкл (конечный объем смеси – 10 мкл). Реакцию секвенирования проводили в термоциклере C1000 (BioRad, США). Термальный профиль реакции: 96°C – 10с, 50°C – 5 с, 60°C – 240 с (25 циклов).

Продукты реакции секвенирования очищали с помощью набора BigDye XTerminator Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Обработка секвенированных последовательностей и филогенетический анализ. Сборка секвенированных последовательностей (assemble), их обработка и хранение осуществлялись в программном пакете Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI 10 Advance с использованием

алгоритма CLUSTAL W (Larkin P. et al., 2007) и матрицы swgapdnamt, а также с использованием программы MAFFT (Katoh, Standley, 2013).

Построение филогенетических деревьев проводили в программе MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Подбор эволюционной модели осуществляли по значению информационного критерия Акаике (AIC) (Akaike, 1974). Для построения применяли методы ближайших соседей (Neighbor Joining, NJ) и максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). Подбор оптимальной модели нуклеотидных замен осуществляли с использованием MEGA 6.0. Оптимальная модель – НКУ. Оценка достоверности реконструированной топологии филогенетических деревьев проводилась с помощью бутстреп-анализа (500 репликаций).

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. Использовали три метода: SLAC, FEL, IFEL (Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.W., 2005; Delpont W. et al., 2010). Уровень значимости для всех трех методов исходно составлял $p=0,1$. При анализе позитивной селекции NA использовали также уровень значимости $p=0,2$.

Моделирование аминокислотных отличий на 3D-моделях HA и NA проводили в программе PyMol 3.0 с использованием молекул HA и NA вирусов гриппа А/свинья/15/30 и А/Калифорния/07/09, доступных в онлайн базе данных Protein Data Bank.

Статистическая обработка. Построение графиков и обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Office Excel 2007 и Statistica 6.0, используя U-критерий Манна-Уитни, критерий Уилкоксона (уровень значимости $p<0,05$) и t-критерий Стьюдента. На гистограммах отображали вертикальные планки погрешностей, отображающих стандартное отклонение.

Глава 3: СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09

3.1.1 Выделение вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с использованием клеточных линий MDCK, MDCK-Siat1, CaCo-2 и куриных эмбрионов

Выделение принципиально новых вариантов и подтипов вирусов гриппа в эпидемические сезоны имеет свои особенности. Сложная комбинация геномных фрагментов вирусов пандемического гриппа 2009 г., несомненно, привела к появлению принципиально нового фенотипа, что отразилось на клинической картине заболеваний, вызванных данным возбудителем и на его биологических свойствах, выраженных, в том числе, и в особенностях выделения данного вируса.

Структура вирусной популяции за пятилетний период с 2009 по 2013 гг. представлена на рис. 3.1. На рис. 3.2. приведена гистограмма, количественно отображающая число разных подтипов вирусов гриппа за изученные сезоны.

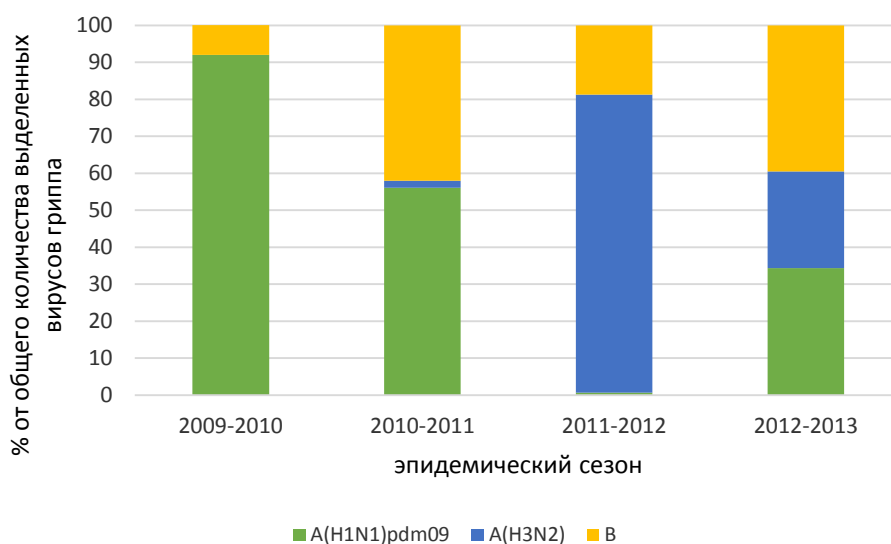


Рисунок 3.1. Структура популяции вирусов гриппа, выделенных в России за пятилетний период с 2009 по 2013 гг.

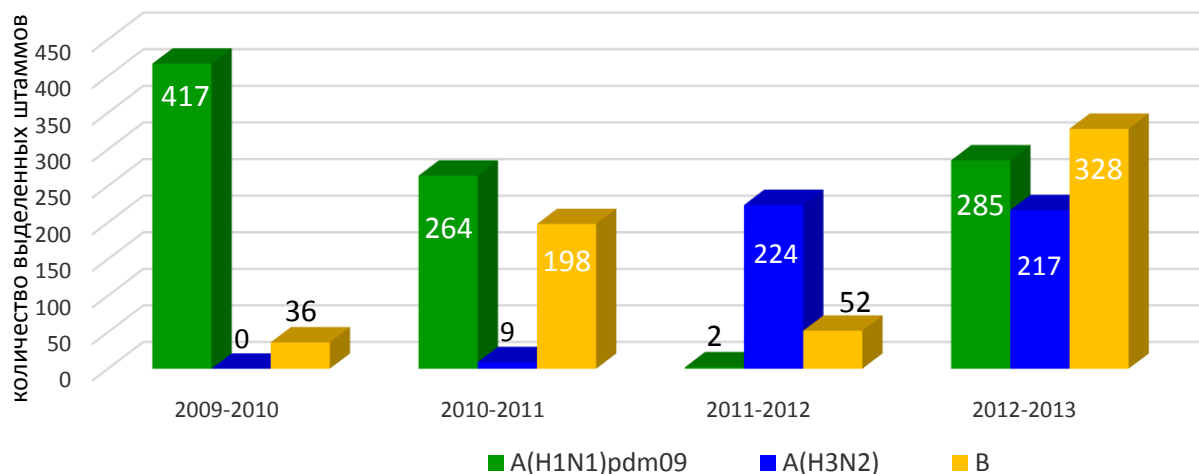


Рисунок 3.2. Количество штаммов вирусов гриппа А и В, выделенных в РФ за период 2009-2013 гг. по данным ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ.

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 СЗО РАМН. За этот период отмечен высокий уровень летальности от пневмоний, развившихся на фоне заболевания гриппом А(Н1N1)pdm09. Так, из БВЛ было получено 309 секционных материала от 161 умершего, у которых в полимеразной цепной реакции прижизненно или постмортально была обнаружена РНК вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. Все пробы, полученные из БВЛ, в том числе и секционный материал, передавались в отдел молекулярной вирусологии НИИ гриппа для проведения ПЦР с целью подтверждения присутствия вирусной РНК в исследуемом материале. За указанный период РНК вируса гриппа А была обнаружено в 1790 пробах от больных. Материалы из Санкт-Петербурга были протестированы на возможность выделения вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 как на КЭ, так и на клетках MDCK. ПЦР-положительные материалы, присланные из БВЛ, также тестировались на двух системах. ПЦР-отрицательные материалы в работу не отбирались. Всего из проб от больных и умерших в Санкт-Петербурге за период с 2009 по 2013 гг. было выделено 559 вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.

Уже начальный этап выделения показал следующую особенность: вирусы пандемического гриппа выделялись и на системе КЭ и на клеточной культуре MDCK, однако при выделении на КЭ титры в реакции ГА, как правило, выше.

Выделение вирусов пандемического гриппа на куриных эмбрионах происходило достаточно эффективно. Большинство вирусов выделялось со значимыми титрами ГА на 1-2 пассаже. Стоит особо отметить, что обычно при заражении вирусами гриппа А куриных эмбрионов, температурный режим инкубации зараженных эмбрионов составляет 34°C, а время инкубации 48 часов. Однако для вирусов пандемического гриппа, как при выделении, так и при накоплении, срок инкубации в 48 часов был недостаточным и оптимальным являлся срок в 72 часа (обычно используемый только для вирусов гриппа В). Температурная зависимость была выражена не так сильно, и значимой разницы при размножении при температуре 33°C, 35°C или 37°C не наблюдалось, поэтому выделение проводилось в условиях 35°C и 72 часов инкубации. Из 559 выделенных вирусов за указанный период, 404 штамма было выделено на куриных эмбрионах. Важно отметить следующую особенность: несмотря на то, что выделяемые вирусы, часто имели невысокие титры ГА, серийные пассажи данных вирусов не всегда приводили к их существенному увеличению. Для большинства выделенных вирусов после серии пассажей наибольшие титры ГА составили 1:64 – 1:128 в реакции с 0,5% взвесью куриных эритроцитов. Более того, 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 ни для эпидемических вирусов А(Н1N1), ни для вирусов подтипа А(Н3N2) предыдущих годов выделения.

Выделение вирусов пандемического гриппа на культуре клеток MDCK. Из 559 выделенных вирусов за указанный период, 330 было выделено на культуре MDCK. Хотя в целом выделение вирусов гриппа на культуре клеток шло достаточно эффективно, стоит отметить, что и здесь возникал ряд сложностей, которые не были отмечены нами ранее при выделении эпидемических вирусов. Многие выделяемые вирусы имели низкие титры, не более 1:8, так же, как и при выделении на эмбрионах.

Последовательные пассажи позволяли лишь незначительно увеличить данный показатель, но не более чем 1:32. Сравнительные характеристики по выделению вирусов в 2009-2013 гг., а также титров вирусов при выделении на культуре клеток и в КЭ в различные эпидемические сезоны приведены на рисунках 3.3 и 3.4.

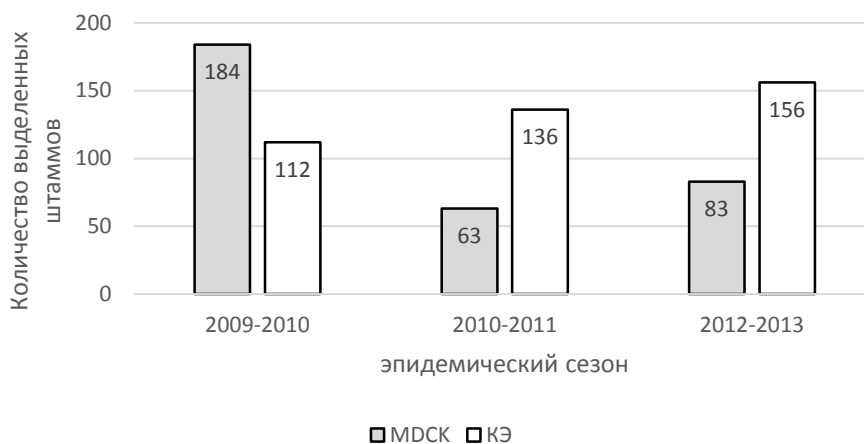


Рисунок 3.3. Выделение вирусов гриппа в сезоны 2009-2013 гг. на культуре клеток MDCK и куриных эмбрионах.

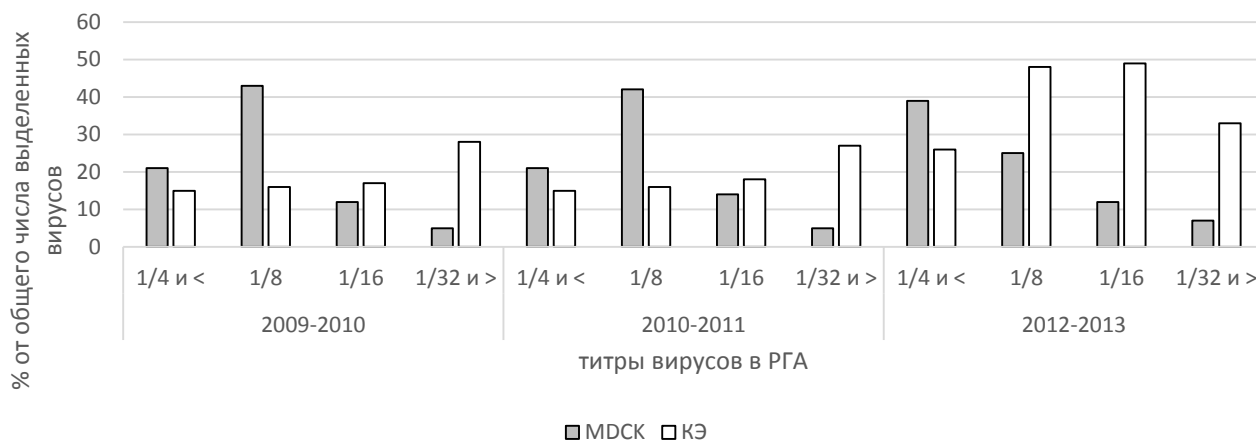


Рисунок 3.4. Сравнительная характеристика титров ГА вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в 2009-2013 гг на КЭ и культуре клеток MDCK.

Выделение вирусов A(H1N1)pdm на куриных эмбрионах из секционных материалов. Поскольку получаемые нами материалы, как правило, нуждались в длительной транспортировке (в среднем 24-72 ч без возможности обеспечения постоянной отрицательной температуры), выделение из таких образцов было

затруднено. В связи с нахождением образцов в течение различного срока при положительных температурах, в них часто развивалась бактериальная флора, что также существенно препятствовало эффективному вирусовыделению. Для выделения вирусов гриппа из секционного материала отбирали фрагменты легких, трахеи, бронхов, селезенки. По опыту выделения за прошедший период времени отметим, что наиболее эффективное выделение происходило из легких и трахеи (67 % и 51% выделенных вирусов), а выделение из селезенки во всех случаях оказалось неэффективным.

Эффективное выделение на эмбрионах (по сравнению с клетками MDCK) связано, прежде всего, с их большей устойчивостью к посторонней микрофлоре. Однако выделяемые из секционного материала вирусы имели низкие титры 1:2 – 1:4. В большинстве случаев требовалось пассирование вирусов для того, чтобы титры ГА были достаточны для типирования вирусов в РТГА и для дальнейшей работы с вирусами, в частности, для лиофилизации выделенных вирусов и их депонирования в музей вирусов гриппа НИИ гриппа.

Выделение вирусов пандемического гриппа из секционных материалов на культуре клеток. Выделение вирусов пандемического гриппа из секционных материалов на культуре клеток было менее результативным. За указанный период лишь 1 вирус A(H1N1)pdm09 (из 52) был выделен из секционного материала на культуре MDCK. Можно предположить, что многоступенчатая обработка секционных материалов (измельчение, гомогенизация, осаждение тканей путем центрифугирования и стерилизующая фильтрация через бактериальный фильтр 0,22 мкм) ведет к значительным потерям инфекционных вирусных частиц. При этом РНК вируса обнаруживается в ПЦР, а выделение оказывается неэффективным. В попытке увеличить процент выделения вирусов гриппа, как из проб от больных, так и из секционного материала, нами были протестированы две дополнительные клеточные линии, получившие распространение в последние годы для выделения вирусов гриппа: генно-модифицированная линия MDCK-Siat1 и линия карциномы ободочной кишки человека CaCO-2.

Выделение вирусов пандемического гриппа из клинических образцов от больных с использованием линии CaCo-2. Для оценки эффективности выделения вирусов гриппа на клетках MDCK и CaCo-2 были отобраны 30 проб, в которых присутствие РНК пандемического гриппа А (H1N1)pdm09 было подтверждено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Были получены следующие результаты: использование клеток MDCK позволило выделить 10 вирусов гриппа, а в клетках CaCo-2 было выделено 9 вирусов (см. табл. 3.1). Титры ГА вирусов, выделенных на обеих клеточных линиях были низкие (1:4 и ниже), однако, последующие 1-2 пассажа увеличивали титры ГА вирусов на клетках MDCK до 1:16-1:32 и на клетках CaCo-2 до 1:8-1:16. Невысокую эффективность выделения вируса А(H1N1)pdm09 можно объяснить, прежде всего, биологической особенностью циркулирующего вируса, по-видимому исходно имеющему меньшее сродство к клеточным линиям как животного, так, и человеческого происхождения, по сравнению с вирусами эпидемического гриппа подтипов А(H1N1) и А(H3N2). Использование линии CaCo-2 не позволило добиться увеличения эффективности выделения вирусов гриппа из ПЦР-положительных проб от больных. Тем не менее, результаты выделения вируса пандемического гриппа с использованием этой линии были сравнимы с результатами, полученными на клетках MDCK.

Выделение вирусов пандемического гриппа из постмортальных материалов с использованием линии CaCo-2. Выделение вирусов проводилось из 30 образцов постмортального материала, в которых была обнаружена вирусная РНК методом ПЦР. Результаты выделения в клетках MDCK были полностью отрицательны, тогда как при использовании клеток CaCo-2 удалось выделить 4 вируса пандемического гриппа (см. табл. 3.1). Титры ГА вирусов были также низкими, но после дополнительных 2-х пассажей (на клетках CaCo-2) титры увеличились до 1:8-1:32.

Таблица 3.1. Эффективность выделения вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 на культурах клеток MDCK и CaCo-2.

Клеточная линия	Выделение вирусов гриппа из проб от больных (назофарингиальные мазки), количество штаммов	Титры в реакции гемагглютинации с эритроцитами человека при выделении вируса	Выделение вируса гриппа из пост-мортальных материалов, кол-во штаммов
	Грипп А(Н1N1)pdm09 N*=30 Ct** ≤ 28	Грипп А(Н1N1)pdm09	Грипп А(Н1N1)pdm09 N=30 Ct ≤ 25
MDCK	10	≤1:4	0
CaCo-2	9	≤1:4	4

* N – общее число ПЦР-положительных проб, отобранных для выделения вирусов гриппа на клеточных линиях MDCK и CaCo-2** Ct – значение порогового цикла в ПЦР в режиме реального времени, при котором была детектирована вирусная РНК в исследуемых пробах/образцах

Таким образом, результат эффективности выделения вирусов гриппа А из клинических образцов от больных на двух клеточных линиях MDCK и CaCo-2 можно считать практически одинаковым. Положительным моментом является выделение 4 вирусов пандемического гриппа из постмортальных материалов только на клетках CaCo-2 при отрицательном результате на клетках MDCK.

Выделение вирусов пандемического гриппа из клинических образцов от больных с использованием линии MDCK-Siat1. Для оценки эффективности выделения вирусов гриппа на клетках MDCK и MDCK-Siat1 были отобраны 152 пробы, в которых присутствие РНК пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 было подтверждено методом ПЦР. Использование клеток MDCK позволило выделить 43 вируса гриппа, а в клетках MDCK-Siat1 было изолировано 39 вирусов. Титры ГА вирусов, выделенных на обеих клеточных линиях варьировали (см. рис.3.5)

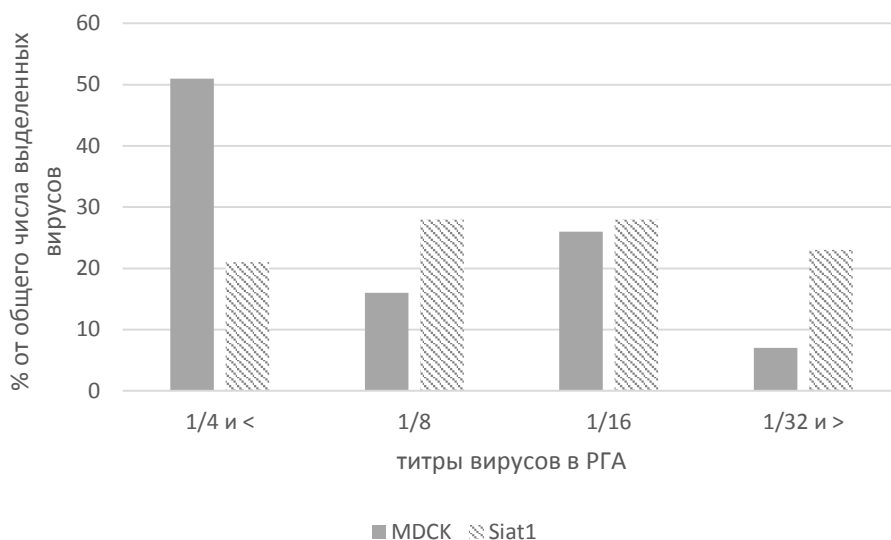


Рисунок 3.5. Титры вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 при выделении на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1.

Использование 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 A(H1N1)pdm09 (30 материалов), выделение вирусов гриппа на этой линии оказалось отрицательным во всех случаях.

3.1.2. Заключение

С момента появления вирусов пандемического гриппа в России летом 2009 г. наблюдается их активная циркуляция на территории РФ за весь изученный период за исключением эпидемического сезона 2011-2012 гг. Абсолютное доминирование данного подтипа среди циркулирующих вирусов гриппа А в 2009-2010 гг постепенно сменилось ко-циркуляцией вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), а также вирусов гриппа В. Отмечено, что для вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 наблюдается тенденция к более предпочтительному размножению

на куриных эмбрионах, чем на клеточной культуре MDCK, а при работе с секционным материалом КЭ являются предпочтительной системой выделения, как с точки зрения эффективности выделения вирусов, так и с точки зрения скорости получения результата. Использование альтернативных клеточных линий (MDCK-Siat1, CaCo-2) не позволило улучшить результаты выделения вирусов гриппа ни при работе с материалами от больных, ни при выделении из секционных материалов.

3.2 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА А(H1N1)pdm09 И ДРУГИХ ВИРУСОВ ГРИППА А ПТИЦ, ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

3.2.1 Особенности репликации вирусов гриппа птиц, животных и человека в перевиваемых культурах клеток

В последние годы для изучения особенностей инфекционного цикла вирусов гриппа А *in vitro* широко используются клеточные линии различного происхождения. Наиболее распространенной линией, обладающей высокой перmissивностью к вирусам гриппа А различных подтипов, является линия MDCK, полученная Madin и Darby из почки собаки MDCK в 1957 г. Однако многие авторы обсуждают вопрос о том, что результаты, полученные на клеточной линии животного происхождения, не могут быть в полной мере использованы в качестве адекватной модели при изучении особенностей патогенеза инфекции с тем, чтобы эти данные можно было экстраполировать на клетки и ткани в организме человека. В связи с этим все более широкое применение находят различные клеточные культуры человеческого происхождения. Появление в 2009 г нового варианта пандемического вируса (Kawaoka Y., Neumann G., 2009) еще раз доказало, что предсказать подтип и время появления нового возбудителя не представляется возможным. При этом, изучение свойств циркулирующих штаммов на моделях клеточных линий, также, как и вариантов вируса, временно вышедших из циркуляции, дает возможность сравнивать особенности инфекционного процесса, вызываемого различными подтипами гриппа А, в том числе и для вновь возникающих штаммов.

В этой связи нами были отобраны вирусы гриппа А человека, птиц и свиньи, и проведено сравнительное изучение их биологических свойств со штаммами гриппа А(H1N1)pdm09 при репродукции на клеточных линиях человека и животных.

3.2.1.1. Отбор и восстановление музейных штаммов вирусов гриппа А

Вирусы гриппа А птиц

Все работы с вирусами гриппа птиц проводились в условиях бокса биологической безопасности, соответствующего международному стандарту BSL3 и сертифицированному для работы со штаммами высокопатогенного гриппа птиц.

Музейные штаммы низкопатогенных вирусов птичьего гриппа подтипа А(Н5N1) были получены из НИИ проблем биобезопасности (Казахстан). Из коллекции музея вирусов гриппа (ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ) был получен штамм высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Курица/Курган/5/05, обладавший высокой инфекционной активностью на куриных эмбрионах (9 lgЭИД₅₀/мл). Штаммы вирусов гриппа А(Н5N1) были протестированы на клетках MDCK для определения их инфекционной активности. По результатам тестирования (см. табл. 3.2) для дальнейшей работы были отобраны 2 низкопатогенных штамма А(Н5N1): А/ Мартын/Костанай/7/07 и А/Золотая Щурка/Чокпак/7а/07, - и высокопатогенный вирус А/Курица/ Курган/5/05.

Таблица 3.2. Инфекционная активность вирусов гриппа птиц А(Н5N1) в культуре клеток MDCK.

Наименование вируса	Титр вируса lgТЦИД ₅₀ /мл
А/ Мартын/Костанай/7/07	7,6
А/Золотая Щурка/Чокпак/7а/07	8,3
А/ Широконоска/Костанай/58/07	5,9
А/Скворец/Костанай/233/07	5,8
А/Скворец/Костанай/236/07	5,7
А/Курица/Курган/5/05	7,2

Вирусы гриппа А человека и свиней

Для сравнительного анализа были выбраны референс-штаммы различного антигенного состава и лет выделения: вирус подтипа А(Н1N1) А/Пуэрто-Рико/8/34 ранних лет выделения (1934), вирус «русского гриппа» А/Хабаровск/74/77, вернувшегося в циркуляцию в 1977 г., а также вирус гриппа свиней А/Свинья/1976/31, несущий НА «классического» гриппа свиней, также, как и вирусы А(Н1N1)pdm09, пандемический вирус подтипа А(Н2N2) А/Сингапур/1/57, а также вирусы сезонного гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2).

Инфекционная активность этих штаммов была проанализирована на клетках MDCK. Результаты сравнительного тестирования приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3. Инфекционная активность вирусов гриппа человека и свиньи в культуре клеток MDCK (lg ТЦИД₅₀/мл).

Наименование вируса	Подтип	lgТЦИД ₅₀ /мл
А/Пуэрто-Рико/8/34	Н1N1	5,1
А/Хабаровск/74/77	Н1N1	5,2
А/Брисбен/59/07	Н1N1	5,9
А/Сингапур/1/57	Н2N2	4,9
А/Брисбен/10/07	Н3N2	5,7
А/Калифорния/7/09	Н1N1pdm09	5,4
А/Санкт-Петербург/5/09	Н1N1pdm09	5,7
А/Свинья/1976/31	Н1N1	5,3

3.2.1.2. Сравнительное изучение репродукции вирусов гриппа А на клеточных культурах человека и животных

Способность вирусов гриппа инфицировать различные клеточные линии во многом зависит от сродства рецептор-связывающего сайта с рецепторами на поверхности клеток. Клеточные культуры обладают разной чувствительностью по отношению к вирусам гриппа. Это зависит как от характера распределения рецепторов на клеточных поверхностях, их количества, так и от свойств рецептор-связывающего сайта гемагглютиниона самих вирусов. Способность вирусов гриппа инфицировать определенный спектр клеточных линий зависит и от подтипа конкретного штамма. В ходе исследования биологических свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с вирусами других подтипов проведено сравнительное изучение чувствительности ряда монослойных клеточных линий человека и животных к тестируемым штаммам. Были выбраны 11 линий: 2 клеточные линии животного происхождения: перевиваемая культура клеток почки кокер-спаниэля MDCK и первичная культура почки новорожденного поросенка СП - и 9 клеточных линий человека: диплоидная культура фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ, культура клеток карциномы легкого А-549, спонтанно трансформированная культура клеток эндотелия ECV-304, культура клеток карциномы ободочной кишки человека CaCo-2, культура клеток моноцитарной лейкемии L-41 (дериват линии HeLa), глиобластомные линии T-98 и A-172, культура клеток рабдомиосаркомы RD и линия клеток предсердия Girardi Heart; описание клеточных линий приведено в таблице 2.3. Результаты сравнительного тестирования представлены в таблице 3.4.

Из приведенной таблицы следует, что наиболее широкий спектр клеточных линий инфицировали вирусы птичьего происхождения, независимо от того, были ли они высоко- или низко- патогенными, что подтверждается данными литературы (Дерябин и др., 2007; Li I.W.S. et al., 2009). Инфекционный титр вирусов А(Н5N1) почти во всех случаях был выше, чем у вирусов гриппа человека. В то же время ни один из исследованных штаммов не был способен эффективно реплицироваться на

клеточной линии предсердия Girardi Heart. Современные эпидемические штаммы подтипов А(Н1N1) и А(Н3N2) реплицировались практически во всех протестированных культурах, однако инфекционные титры были ниже, чем у вирусов гриппа А(Н5N1). Исключением является линия глиобластомы Т-98, на которой наивысший Ig ТЦИД₅₀/мл отмечался для штамма А/Брисбен/59/07. Для вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09, также как и для вируса гриппа свиней подтипа А(Н1N1), отмечалась принципиально другая картина. Данные вирусы репродуцировались на ограниченном спектре клеточных линий, и инфекционная активность почти во всех случаях была ниже таковой для других протестированных штаммов. Интересен тот факт, что даже на линии свиного происхождения СП данные штаммы показывали значительное снижение инфекционной активности по сравнению с клетками MDCK. Вирус А/Хабаровск/74/77 (Н1N1) демонстрировал слабую репродукцию почти на всех клеточных линиях, в то время как штамм А/Пуэрто Рико/8/34 (Н1N1) по показателям инфекционной активности был более приближен к современным эпидемическим вирусам гриппа человека. Возможно, это объясняется множественностью пассажей А/Пуэрто Рико/8/34 и лабораторной адаптацией данного вируса, т.к. генетически этот вирус наиболее близок вирусам «классического» гриппа свиней. Отдельно стоит отметить тот факт, что помимо линии MDCK – «золотого стандарта» для выделения и культивирования вирусов гриппа – только одна линия из протестированных показала уровень чувствительности к тестируемым штаммам, сравнимый с почкой собаки. Это клеточная культура карциномы ободочной кишки человека CaCo-2, на которой уровень инфекционной активности вирусов был сравним со значениями, полученными для MDCK. Эти данные согласуются с данными литературы (Li I.W.S. et al., 2009), и в настоящее время данная линия многими исследователями признана перспективной для работы с вирусами гриппа человека, птиц и свиней (Chiaroni C. et al., 2010; Lombardo T. et al., 2012)

Таблица 3.4. 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/Хабаровск/ 74/77	А/Брисбен/ 59/07	А/Сингапур/ 1/57	А/Брисбен/ 10/07
	(H5N1)*	(H5N1)**	(H5N1)**	(H1N1)	(H1N1)pdm	(H1N1)pdm	(H1N1)	(H1N1)	(H1N1)	(H2N2)	(H3N2)
	культуры клеток животного происхождения										
MDCK	7,18	7,55	8,3	5,3	5,4	5,7	5,1	5,2	5,9	4,9	5,7
СП	7,1	6,9	7,8	3,8	2,8	3,4	4,4	4,2	4,8	3,2	5,4
	культуры клеток человека										
А-549	3,8	3,5	3,4	<1	<1	<1	3,8	2,1	2,8	2,2	3,2
ECV-304	6,2	5,7	5,8	2,2	<1	2,8	3,4	3,0	2,9	3,2	4,1
ФЛЭЧ	4,2	3,7	3,2	<1	<1	<1	3,4	2,4	3,2	–	2,8
CaCo-2	7,1	7,2	7,1	4,7	4,9	4,3	4,7	4,9	5,1	4,6	5,5
L-41	4,4	4,0	5,5	<1	<1	<1	2,6	2,0	2,8	2,3	2,6
RD	4,7	5,2	5,8	1,8	2,4	<1	2,8	2,2	5,8	–	4,7
T-98	3,4	4,6	5,2	<1	2,2	<1	2,7	–	5,6	2,5	3,1
А-172	2,8	2,4	2,4	2,4	<1	<1	2,5	2,1	2,2	2,2	2,4
Girardi Heart	–	–	–	–	–	–	–	1,6	1,8	1,8	–

* - высокопатогенный штамм гриппа птиц; ** - низкопатогенный штамм гриппа птиц; “–” отсутствие инфекционной активности.

Результаты в таблице представлены в виде lg ТЦИД₅₀/мл.

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 репродукции исследуемых вирусов на некоторых линиях человека и животных в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител к высококонсервативному 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, как следует из таблицы 3.5, инфекционная активность этих вирусов, рассчитанная с применением ИФА, была ниже по сравнению с вирусами гриппа птиц и вирусами сезонного гриппа А(Н3N2).

Таблица 3.5. Чувствительность клеточных линий человека и животных к вирусам гриппа А различного происхождения (метод ИФА).

Клеточная Культура/ Вирус гриппа (подтип)	Вирусы гриппа					
	птиц		свиней	человека		
	А/Курица/ Курган/ 5/05 (H5N1)	А/З.Щурка/ Чокпак/ 7a/07 (H5N1)	А/Свинья/ 1976/31 (H1N1)	А/Санкт- Петербург/ 05/09 (H1N1)pdm	А/Брис бен/ 59/07 (H1N1)	А/Брис бен/ 10/07 (H3N2)
МДСК	8,2	7,9	4,3	4,5	5,8	6,0
СП	7,6	7,8	3,4	4,2	5,6	5,7
А-549	4,8	4,4	3,2	3,8	4,0	4,3
ECV-304	6,0	6,1	4,0	4,3	4,7	5,3
ФЛЭЧ	4,3	4,4	2,8	2,7	3,4	3,7
CaCo-2	7,7	7,4	3,9	4,2	5,3	5,6

Результаты представлены в виде инфекционной активности, рассчитанной по методу предельных разведений Рида и Мюнча. За предельное разведение в котором присутствовал вирус принималось такое значение оптической плотности в ИФА, при котором ОП опыта отличалось от ОП контроля в не менее чем в 2 раза.

3.2.2. Особенности гибели клеток человека в культуре при инфицировании вирусами гриппа птиц, животных и человека

Из данных литературы известно, что гриппозная инфекция индуцирует апоптоз практически во всех клеточных линиях, протестированных в эксперименте, однако его интенсивность сильно варьирует в зависимости от подтипа тестируемого вируса. Для изучения индукции апоптоза *in vitro* вирусами гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с вирусами гриппа других подтипов нами были изучены вирусная репродукция и индукция апоптоза на культурах клеток человека А-549, ECV-304 и ФЛЭЧ, поскольку процесс апоптоза в клетках MDCK был изучен достаточно подробно и описан в работах зарубежных исследователей (Price et al., 1997; Morris et al., 1999; Moshin et al., 2002).

3.2.2.1. Изучение апоптоза в клеточных линиях человека с использованием световой люминесцентной микроскопии и красителя Hoechst-33258

Анализ репродукции вирусов гриппа птиц, свиней и человека на культурах клеток карциномы легкого А-549, эндотелия ECV-304 и фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ показал, что несмотря на то, что репродукция вирусов пандемического гриппа и гриппа свиней была в них снижена, эти вирусы, так же, как и вирусы сезонного гриппа, и вирусы птичьего гриппа, вызывавшие цитопатические изменения в исследуемых клетках, эффективно индуцировали апоптоз в указанных клеточных линиях.

Морфологическое обнаружение апоптоза в исследуемых культурах клеток основывается, прежде всего, на изменении морфологии ядра. При окрашивании ядер клеток флуоресцентным красителем Hoechst-33258, связывающимся с клеточной ДНК, наблюдаются типичные отличия между ядрами здоровых, живых клеток и ядрами клеток, претерпевших апоптоз (Манских В.Н., 2004; Galluzzi L. et al., 2009). Были использованы следующие отличительные критерии, характерные для апоптотических клеток:

1) маргинация хроматина, выражающаяся в конденсации хроматина по периферии ядра. В результате на окрашенных препаратах часто обнаруживаются ядра в виде полусфер или в форме полумесяцев

2) неровность контуров ядра, видимая на препаратах в виде ядер с отдельными лопастями, которые впоследствии распадаются на микроядра (процесс кариорексиса)

3) конденсация хроматина, наблюдаемая на препаратах в виде «пятнистости» ядерного хроматина, которую многие исследователи связывают со специфической межнуклеосомной деградацией хроматина

На рисунке 3.6. представлены фотографии препаратов клеток, окрашенных Hoechst-33258, в которых отмечаются морфологические критерии апоптоза, рассмотренные выше.

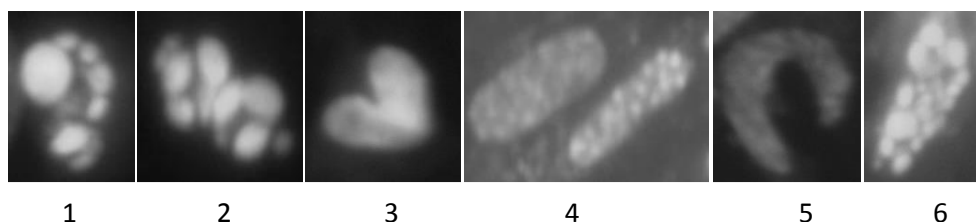


Рисунок 3.6. Морфологические изменения в ядрах клеток, окрашенных Hoechst-33258 при вирус-индуцированный апоптозе в культурах клеток человека. Увеличение 450 (иммерсия).

1,3 – А-549; 2 – ECV-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, выражающаяся в их «зернистости»

Наибольшей чувствительностью к вирус-индуцированному апоптозу обладали клетки карциномы легкого А-549, в то время как диплоидные фибробласты ФЛЭЧ оказались наименее чувствительной культурой. Время, необходимое для индукции апоптоза, варьировало: наиболее ранний апоптоз отмечался при инфекции вирусами гриппа подтипов А(Н5Н1) и А(Н3Н2) – через 16-18 ч, в то время как вирусы подтипа А(Н1Н1) индуцировали апоптоз не ранее

чем через 20 ч после инфекции (при одинаковой МИ=0,1). Через 18-22 ч при окрашивании клеточного монослоя красителем Hoechst-33258 наблюдались изменения ядерного хроматина, характерные для клеток при активации программируемой клеточной смерти (см. рис.3.6).

Полученные при подсчете апоптотически измененных клеток результаты выражались в виде индекса апоптоза – количественного параметра, позволяющего сравнить интенсивность индукции апоптоза различными штаммами вирусов гриппа типа А. Результаты сравнительного изучения апоптоза, индуцированного вирусами гриппа разного происхождения, представлены на примере клеточной линии А-549 на рисунке 3.7.

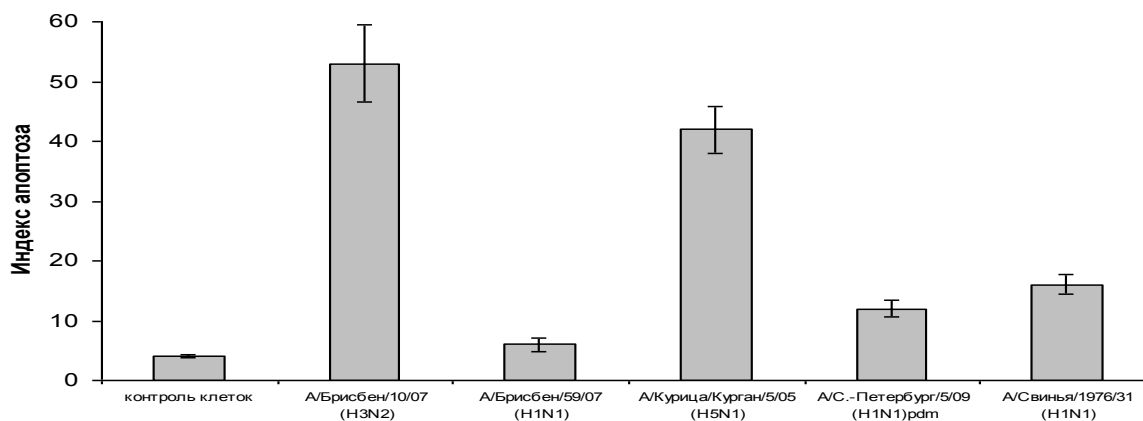


Рисунок 3.7. Апоптоз в клеточной линии карциномы легкого человека А-549, индуцированный вирусами гриппа различного происхождения (МИ=0,1) через 20 ч после заражения.

Статистическое отличие от контроля отмечено для всех вариантов с использованием критерия Уилкоксона при уровне значимости $p < 0,05$: А/Брисбен/10/07 ($p=0,021$), А/Брисбен/59/07 ($p=0,022$), А/Курица/Курган/5/05 ($p=0,002$), А/Санкт-Петербург/5/09 ($p=0,022$), А/Свинья/1976/31 ($p=0,022$). Статистическое отличие при уровне значимости $p < 0,05$ отмечено для вирусов гриппа А/Брисбен/10/07 ($p=0,011$) и А/Курица/Курган/5/05 ($p=0,016$) от вируса гриппа А/Санкт-Петербург/5/05. Между вирусами гриппа подтипов А(H1N1) и А(H1N1)pdm статистически достоверных отличий не зарегистрировано.

Наиболее интенсивный апоптоз во всех трех клеточных линиях отмечался при инфицировании клеток штаммами гриппа подтипов А(H3N2) и А(H5N1), что согласуется с данными литературы, полученными для клеточной линии MDCK. (Price et al., 1997). При этом, на сроке 20 ч индекс апоптоза для вирусов А(H5N1)

был несколько ниже, чем для вирусов А(Н3N2). Возможно, это объясняется тем, что через 20 ч (когда апоптоз при инфекции другими подтипами вируса гриппа был наиболее выражен) в образцах, инфицированных гриппом подтипа А(Н5N1) многие клетки, вступившие в апоптоз, были мертвы и отделились от поверхности стекла.

Индексы апоптоза для вирусов пандемического гриппа и гриппа свиней были сходны и не обнаруживали достоверной разницы, а наиболее низкое значение индекса апоптоза отмечено для штамма А/Брисбен/59/07 (Н1N1), что хорошо согласуется с данными, полученными другими исследователями на линии MDCK (Price et al., 1997; Morris et al., 1999).

3.2.2.2. Использование биохимических маркеров для выявления апоптоза, индуцируемого вирусами гриппа А, в клеточных линиях человека.

Хотя морфологические изменения, наблюдаемые при апоптозе, подробно описаны и служат достаточно надежным критерием его наличия, считается, что для повышения достоверности получаемых данных необходимо использование нескольких методических подходов для верификации полученных данных. В этой связи нами были использованы следующие биохимические маркеры для подтверждения апоптоза в исследуемых культурах клеток:

- 1) Аннексин V, меченный флуоресцеинизотиоцинатом, специфически связывающий фосфатидилсерин во внешнем листке липидного бислоя. Переход фосфатидилсерина из внутреннего листка бислоя во внешний служит одним из ранних критериев апоптоза
- 2) Йодид пропидия – интеркалирующий в ДНК клеток флуоресцирующий краситель. Используется для выявления некротических клеток, т.к. не проникает через мембрану живых клеток. Поскольку при апоптозе целостность клеточных мембран не нарушается, йодид пропидия не окрашивает апоптозные клетки
- 3) Тетраметилродаминовый эфир (ТМРЭ) – липофильный флуоресцентный краситель, легко проникающий как через цитоплазматическую, так и

через митохондриальную мембраны. В здоровых клетках, а также клетках на ранних и средних стадиях апоптоза, ТМРЭ окрашивает митохондрии и дает интенсивную флуоресценцию.

- 4) 7-аминоактиномицин D (7-ААД) - интеркалирующий в ДНК клеток флуоресцирующий краситель. Также, как йодид пропидия используется для выявления некротических клеток, т.к. не проникает через мембрану живых клеток.

Для проведения экспериментов были выбраны три вируса гриппа типа А: А/Курица/Курган/5/05 (H5N1), А/Брисбен/10/07 (H3N2) и А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1)pdm09. Поскольку все красители, используемые в опыте, флуоресцентные, опыт проводили в черных 96-луночных планшетах, в которых микроскопирование клеток провести невозможно. В этой связи присутствие клеток на планшете и их концентрацию подтверждали за счет окрашивания монослоя красителем Hoechst 33343 (Еропкин М.Ю., Кулева Н.В., 2008). Все опыты ставили в параллели: на одной планшете производили одновременное окрашивание в лунках аннексином V, йодидом пропидия и Hoechst 33343, на другом - аннексином V, ТМРЭ, 7-аминоактиномицин D и Hoechst 33343. Результаты представлены в таблице 3.6.

Из данных, полученных в ходе эксперимента было установлено, что ни в одном из случаев не наблюдалось значимых отличий флуоресценции в опытных лунках от контрольных для йодида пропидия, ТМРЭ и 7-ААД. Ни йодид пропидия, ни 7-ААД не окрашивали клетки ни в опыте, ни в контроле. Поскольку данные молекулы не способны проникать через мембраны живых клеток, это свидетельствует о жизнеспособности культур клеток, использованных в опытах. Дополнительным подтверждением жизнеспособности клеток и целостности митохондриальной мембраны клетки служило окрашивание ТМРЭ и наблюдаемая при этом флуоресценция, отмеченная как в контроле клеток, так и в опыте. Окрашивание аннексином V контрольных клеток не выявило флуоресцентного сигнала, что

Таблица 3.6. Интенсивность флуоресценции красителей, использованных для выявления апоптоза в культурах клеток человека (МИ=0,1, срок – 18 ч после заражения).

	Краситель/ вирус	контроль клеток	А/Курица/ Курган/ 5/05	А/Брисбен/ 10/07	А/Санкт- Петербург/ 5/09
Интенсивность флуоресценции					
А-549	аннексин V	0,15±0,05	28,3±1,5* \ddagger	23,1±1,7*	20,9±2,2*
	йодид пропидия	0,015±0,005	0,016±0,004	0,011±0,002	0,013±0,002
	ТМРЭ	14,3±1,6	14,2±1,9	16,8±2,6	15,2±2,9
	7-ААД	0,35±0,05	0,23±0,02	0,3±0,02	0,34±0,07
	Ноеchst 33343	13,8±2,1	11,9±1,6	13,6±1,4	15,1±2,7
ЕСУ-304	аннексин V	0,26±0,04	25,9±2,2* \ddagger	24,6±4,2*	18,6±1,8*
	йодид пропидия	0,014±0,002	0,011±0,002	0,012±0,004	0,013±0,003
	ТМРЭ	15,8±2,4	14,2±2,6	15,2±1,6	14,2±2,2
	7-ААД	0,3±0,08	0,32±0,08	0,29±0,1	0,26±0,07
	Ноеchst 33343	51,5±2,6	46,7±4,9	54,7±5,9	48,4±3,7
ФЛЭЧ	аннексин V	0,18±0,04	20,4± 2,4*	18,9±3,2*	15,5±2,4*
	йодид пропидия	0,012±0,003	0,011±0,004	0,014±0,007	0,01±0,003
	ТМРЭ	14,2±2,3	13,6±2,3	13,8±1,4	14,2±1,1
	7-ААД	0,17±0,09	0,24±0,1	0,17±0,05	0,14±0,03
	Ноеchst 33343	13,2±1,3	13,5±2,2	13,2±1,4	12,4±1,6

Символом * в таблице отмечены значения флуоресценции для аннексина V в опытных лунках достоверно отличающиеся от значения его флуоресценции в контроле клеток, символом \ddagger - значения флуоресценции для опытных лунок с вирусом А(Н5N1), достоверно отличающиеся от опытных лунок с вирусами подтипа А(Н1N1)pdm09 (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05)

свидетельствует о том, что в контрольных клетках уровень фосфатидилсерина во внешнем листке цитоплазматической мембраны клеток был ниже детектируемого предела. Однако во всех трех культурах, инфицированных вирусами гриппа А (МИ=0,1), через 18 ч наблюдалась отчетливая флуоресценция для аннексина V, достоверно отличимая от контроля клеток. При этом, интенсивность флуоресценции в опытных образцах, зараженных вирусами гриппа А(Н5N1) по U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$) достоверно отличалась от уровня сигнала в лунках, зараженных вирусом гриппа (H1N1)pdm09; для вирусов гриппа А(Н3N2) таких отличий не выявлено. В опытных образцах разных культур клеток, зараженных вирусом одного подтипа достоверных отличий по интенсивности флуоресценции также не установлено.

Таким образом, флуоресценция в клетках, окрашенных аннексином V и отсутствие окраски йодидом пропидия подтверждают данные световой люминесцентной микроскопии об индукции апоптоза в монослойных клеточных культурах человека А-549, ECV-304 и ФЛЭЧ. Сравнение интенсивности флуоресценции показало, что наиболее интенсивный сигнал обнаруживается в пробах, инфицированных вирусами гриппа А(Н5N1), в то время как для вирусов пандемического гриппа 2009 г. А(Н1N1)pdm09 выявляется более слабая интенсивность флуоресценции, что совпадает с данными, полученными в ходе подсчета индекса апоптоза методом световой микроскопии.

3.2.3 Характеристика активности нейраминидазы вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в сравнении с другими вирусами гриппа птиц, животных и человека

Для сравнения биологических свойств вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 с вирусами эпидемического гриппа, а также вирусами гриппа птиц и свиней была также изучена активность нейраминидазы в тесте MUNANA, подробно описанном в руководстве ВОЗ и других работах (WHO manual, 2011). Были выбраны вирусы, содержащие разные антигенные формулы в сочетании с нейраминидазой подтипа N1, а также несколько вирусов с нейраминидазой подтипа N2. Проведенные тесты позволили установить следующее. Наибольшей

активностью обладали вирусы, содержащие нейраминидазу подтипа N2, а также вирусы гриппа птиц A(H5N1), независимо от степени их патогенности (см. табл. 3.7). Интересно, что для высокопатогенного штамма A/кураца/Курган/5/05 отмечена высокая активность нейраминидазы - $36,93 \pm 0,92$ мкмоль 4-MU/мл*мин для штамма, выращенного на КЭ, в то время как для MDCK-варианта этого вируса активность нейраминидазы значительно снижена и составляет $12,48 \pm 0,98$ мкмоль 4-MU/мл*мин, что свидетельствует о функциональном дисбалансе поверхностных белков вируса, переведенного в неоптимальную среду для размножения. Вирусы гриппа свиней, выделенные в разные годы, и относящиеся к разным генетическим линиям, обладали вариабельной активностью нейраминидазы. Наиболее выраженной она была для штамма «птичьего» происхождения, т.е. несущего N1, близкородственную NA подтипа N1 вирусов гриппа птиц и составляла $29,6 \pm 3,04$ мкмоль 4-MU/мл*мин, в то время как для вирусов классического гриппа свиней активность нейраминидазы была схожей с эпидемическими вирусами гриппа человека и вирусами гриппа A(H1N1)pdm09 и различалась в пределах $7,33 \pm 0,28 - 22,87 \pm 1,15$ мкмоль 4-MU/мл*мин (см. рис. 3.8). Активность нейраминидазы вирусов A(H1N1)pdm09 разных лет выделения также варьировала, составляя от 9,6 до 35,34 мкмоль 4-MU/мл*мин (см. рис. 3.9). В попытке установить причины такой вариабельности нами были проанализированы первичные АК последовательности NA для тех штаммов вирусов, для которых они были доступны, а также проверены вирусы, выращенные на разных системах выделения (MDCK, КЭ). Помимо этого, было проведено сравнительное тестирование штаммов, приведенных к одинаковому титру по ГА. Стоит отметить, что зависимости активности NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 от титра вируса выявлено не было: приведение тестируемых вирусов к одинаковому титру по ГА не изменяло активность нейраминидазы; также эта зависимость не была отмечена и для различных систем выделения: штаммы, выделенные на MDCK, имеют сравнимую активность NA с таковыми, выделенными на КЭ. Анализ аминокислотных последовательностей также не всегда позволяет установить причину выраженных отличий по активности NA.

Таблица 3.7. Активность нейраминидазы вирусов гриппа птиц, свиней и человека различных подтипов в тесте MUNANA.

Наименование вируса	Система накопления	Подтип НА и НА	Активность НА, мкмоль 4-MU/мл*мин
А/Япония/305/57	КЭ	H2N2	30,32±1,77
А/Сингапур/1/57	КЭ		33,54±0,45
А/Ленинград/127/67	КЭ		28,07±1,89
А/серебристая чайка/Казахстан/2006	КЭ		31,08±0,67
А/свинья/Англия/94	КЭ	H1swN2	26,83±2,55
А/курица/Курган/5/05	КЭ	H5N1	36,93±0,92
А/курица/Курган/5/05	MDCK		12,48±0,98
А/зол. щурка/Чокпак/7а/07	КЭ		32,6±0,23
А/мартын/Костанай/7/07	КЭ		32,32±1,35
А/серебр.чайка/Сарма/51с/06	КЭ	H6N1	34,53±0,61
А/свинья/Айова/15/30	КЭ	H1swN1	25,35±0,65
А/свинья/США/1976/31	КЭ		17,99±2,24
А/свинья/Англия/86 (классич)	КЭ		7,33±0,28
А/свинья/Англия/92 (птичий)	КЭ		29,6±3,04
А/свинья/Осельки/17/14	MDCK	H1N1pdm09 свиней	18,58±0,76
А/свинья/Осельки/25/14	MDCK		22,87±1,15
А/свинья/Осельки/56/14	MDCK		18,58±3,04
А/Пуэрто-Рико/8/34	КЭ	H1N1 эпидемический	6,9±0,65
А/Нью Джерси/8/76	КЭ		14,15±2,55
А/Хабаровск/74/77	КЭ		17,96±1,41
А/Брисбен/59/07	КЭ		36,09±1,38
А/Владивосток/1/09*	КЭ		18,71±1,21
А/Калифорния/07/09	КЭ	H1N1pdm 09	18,08±0,69
А/Крайстчерч/16/10	КЭ		19,01±2,06
А/Санкт-Петербург/5/09	КЭ		35,34±0,33
А/Санкт-Петербург/27/11	КЭ		32,46±3,02
А/Санкт-Петербург/56/09	КЭ		29,55±1,64
А/Санкт-Петербург/202/09	КЭ		29,68±0,96
А/Санкт-Петербург/204/09	КЭ		22,66±0,74
А/Воронеж/2/09	КЭ		25,89±0,3
А/Калининград/4/11	КЭ		23,72±6,42
А/Мурманск/1/11	КЭ		18,15±0,9
А/Санкт-Петербург/45/11	КЭ		16,45±5,05
А/Астрахань/35/11	КЭ		9,16±1,39
А/Гонконг/5659/12	MDCK		20,95±0,44
А/Екатеринбург/11/13	КЭ		7,82±0,16
А/Москва/18/13	MDCK		23,33±0,67
А/Санкт-Петербург/151/13*	MDCK		12,41±0,47

* озельтамивир-устойчивые штаммы

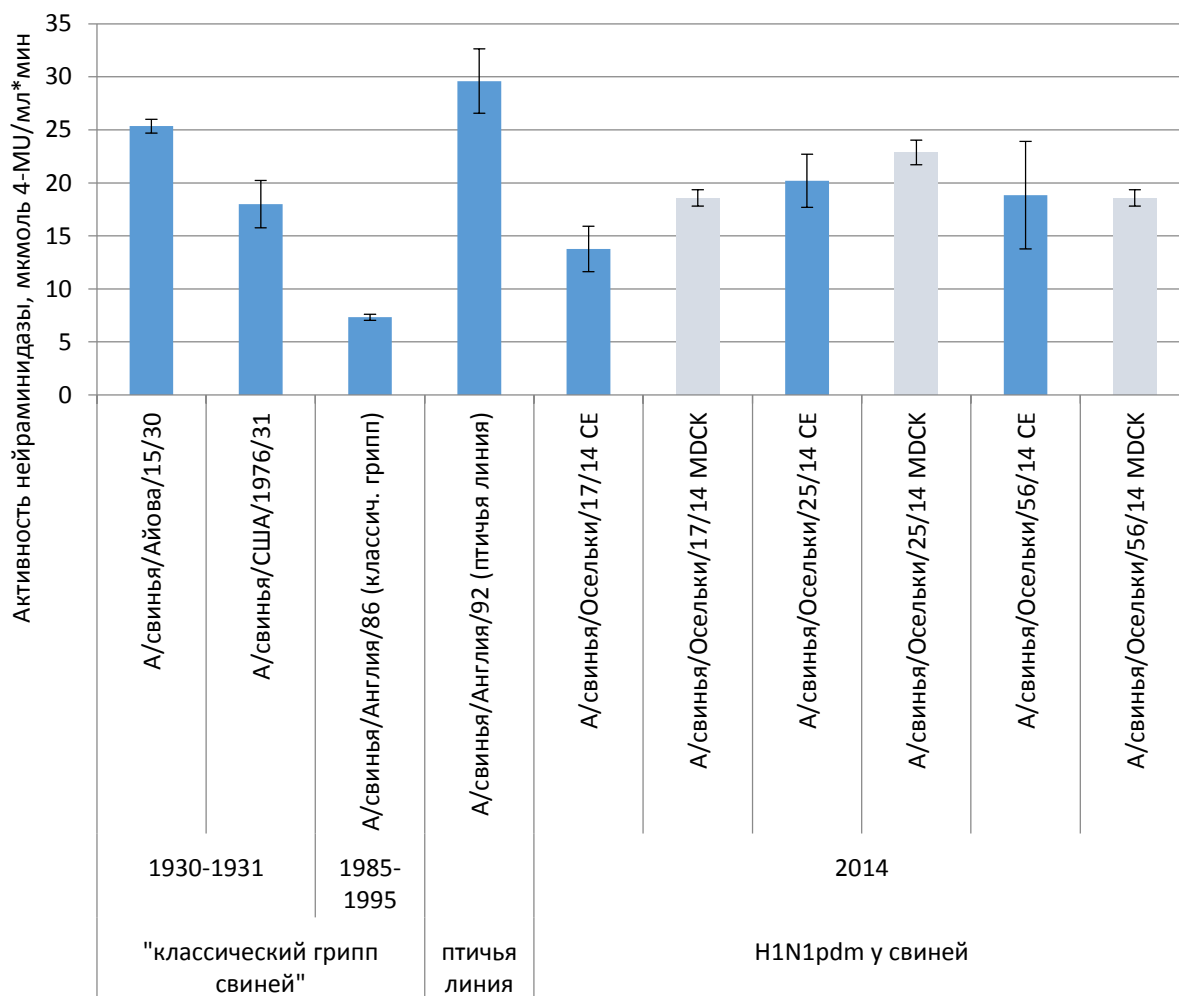


Рисунок 3.8. Активность нейраминидазы в тесте MUNANA вирусов гриппа свиней.

Вирусы, накопленные на куриных эмбрионах (CE) отмечены голубыми столбцами, вирусы, выращенные на культуре клеток MDCK представлены бледно голубыми столбцами.

В целом, за исключением отдельных штаммоспецифических отличий можно констатировать, что вирусы гриппа птиц подтипа A(H5N1), также как и вирусы гриппа птиц и человека A(H2N2) имеют статистически более высокую активность NA в тесте MUNANA (при $p < 0,05$), чем вирусы гриппа свиней и вирусы пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, что хорошо согласуется с данными, полученными другими авторами.

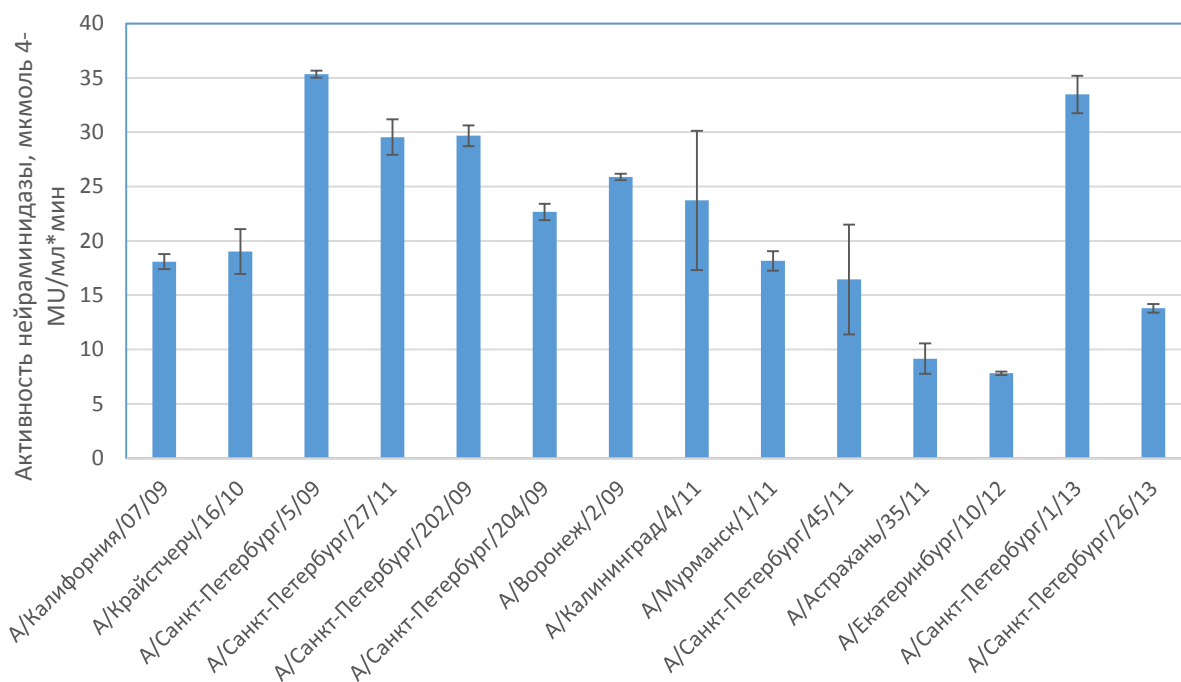


Рисунок 3.9. Активность нейраминидазы в тесте MUNANA вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 разных лет выделения.

3.2.4. Заключение

По результатам тестирования ряда биологических свойств вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 можно заключить, что вирусы данного подтипа реплицируются в большинстве перевиваемых клеточных линий человеческого происхождения менее интенсивно, чем вирусы гриппа человека подтипов А(Н1N1), А(Н2N2), А(Н3N2), и вирусы гриппа птиц подтипа А(Н5N1). Протестированные штаммы подтипа А(Н1N1)pdm09 являются слабыми индукторами апоптоза в линиях А-549, ECV-304 и ФЛЭЧ по сравнению с вирусами гриппа птиц и вирусами гриппа человека А(Н3N2). В этом отношении их свойства схожи с вирусами гриппа свиней, протестированных для сравнения в эксперименте. Активность нейраминидазы вирусов пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 не превосходит таковую эпидемических штаммов гриппа и вирусов гриппа свиней. Наиболее выраженная репродукция в клеточных линиях человека отмечена для вирусов подтипа А(Н5N1), для которых характерна и более высокая активность нейраминидазы, и наиболее быстрая и интенсивная индукция апоптоза среди всех протестированных вирусов гриппа птиц, свиней и человека

3.3 АНТИГЕННЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09

3.3.1. Сравнение данных антигенного анализа, полученных с использованием хорьковых и крысиных антисывороток

Реакция торможения гемагглютинации остается основным инструментом надзора за антигенными характеристиками вирусов гриппа (WHO manual, 2011). При этом международным принятым по рекомендации ВОЗ стандартом служат хорьковые постинфекционные антисыворотки, поскольку модель гриппозной инфекции у хорьков при интраназальном капельном заражении считается наиболее приближенной к заболеванию у человека (Bouvier N.M., Lowen A.C., 2010). В то же время, содержание, разведение и экспериментальная работа с хорьками представляют немалые трудности. Многие лаборатории в России уже длительное время с успехом используют для РТГА крысиные поликлональные антисыворотки, полученные путем внутрибрюшинной инъекции белых крыс эталонными и эпидемическими штаммами гриппа. Сотрудничающий центр ВОЗ в Лондоне (Великоритания) любезно предоставил нам панель хорьковых антисывороток и антигены, к которым эти сыворотки были получены. Нами были получены крысиные поликлональные антисыворотки к этим же антигенам и проведено сравнительное исследование результатов РТГА с крысиными и хорьковыми антисыворотками для исследования возможности применения крысиных антисывороток при проведении антигенного анализа вирусов гриппа человека подтипа А(Н1N1)pdm09.

Учитывая естественный путь заражения и выработку антител у хорьков в процессе инфекции, имитирующей заболевание гриппом у человека, постинфекционные хорьковые антисыворотки обладают более высокими титрами антител по сравнению с большинством крысиных антисывороток. Однако титры антисывороток, получаемые при иммунизации крыс, достаточны для четкой интерпретации результатов антигенного анализа. В таблицах 3.8 и 3.9 представлены сравнительные данные, полученные в РТГА с использованием в параллели антисывороток хорьков и крыс, полученных к одним и тем же

антигенам. Результаты тестирования эталонных и референс-штаммов, отмеченных выделенным шрифтом, показывают, что почти во всех случаях данные, полученные с использованием обоих типов сывороток, различаются не более чем на $1/2$ - $1/4$ гомологичного титра, что находится в пределах естественных колебаний ошибки измерения. Наибольшие отличия в РТГА при взаимодействии с крысиными и хорьковыми антисыворотками наблюдались при тестировании эпидемических изолятов. В отдельных случаях разница составила $1/8$ - $1/32$ гомологичного титра, что может свидетельствовать о более дифференцированном взаимодействии крысиных/хорьковых антисывороток с изменяющимися эпитопами в НА современных вирусов. Так, вирусы пандемического гриппа А/Львов/6/09 и А/Астрахань/35/11 реагировали с хорьковыми антисыворотками, полученными к эталонному вирусу А/Калифорния/07/09 до гомологичного титра, в то время как с крысиными антисыворотками лишь на $1/4$ гомологичного титра, что указывает на небольшую вариацию данных штаммов от эталонного штамма. Позднее было установлено, что эти вирусы обладают определенным набором аминокислотных замен, на основании которых они были выделены в отдельные генетические группы. Наибольшие отличия были получены при сравнении антисывороток, полученных к референс-вирусу А/Крайстчерч/16/10. Крысиная антисыворотка к данному вирусу реагировала со всеми изолятами в пределах 1 - $1/4$ гомологичного титра, в то время как хорьковая антисыворотка дифференцировала вирусы подобные данному штамму (А/Санкт-Петербург/202/09), дрейф-варианты, реагировавшие до $1/8$ - $1/16$ гомологичного титра (А/Воронеж/2/09, А/Мурманск/1/11, А/Санкт-Петербург/45/11 и др.) и антигенно отличные от него штаммы А/Санкт-Петербург/204/09 и А/Екатеринбург/10/12, реагировавшие лишь на $1/32$ гомологичного титра и отличающиеся также от другого современного референс-вируса А/Гонконг/5659/12. Для вируса А/Санкт-Петербург/204/09 наблюдалась обратная картина при сравнении результатов, полученных с антисыворотками против вируса А/Санкт-Петербург/27/11: здесь хорьковая антисыворотка давала отличие всего в $1/2$ гомологичного титра, в то время как

Таблица 3.8. Сравнительные данные по РТГА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с крысиными и хорьковыми антисыворотками, обратные гомологичные титры антисывороток.

Антисыворотка Вирус	А/Калифорния/07/09		А/Окленд/03/09		А/Гонконг/2212/10		А/Львов/06/09	
	крысиная (т. 640)	хорьковая (т. 2560)	крысиная (т. 1280)	хорьковая (т. 5120)	крысиная (т. 640)	хорьковая (т. 5120)	крысиная (т. 640)	хорьковая (т. 5120)
А/Калифорния/07/09	640	2560	160	1280	160	1280	160	2560
А/Окленд/03/09	640	640	1280	5120	320	2560	320	5120
А/Гонконг/2212/10	320	640	320	1280	640	5120	160	5120
А/Львов/06/09	160	2560	160	640	320	1280	640	5120
А/С.Петербург/109/11	160	1280	160	640	160	640	160	2560
А/С.Петербург/27/11	640	640	160	1280	160	640	80	1280
А/Астрахань/35/11	160	2560	160	5120	160	5120	80	1280
А/С.Петербург/09/11	640	2560	640	5120	640	5120	320	1280

Здесь и в табл.3.9: сравнительный антигенный анализ изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации с использованием крысиных и хорьковых поликлональных антисывороток и эритроцитов кур (0,5%), полученных к референс-вирусам, а также актуальным эпидемическим штаммам 2009-2013 гг. выделения. Приведенные значения в таблицах являются обратными титрами в РТГА с соответствующими антисыворотками, полученными путем двукратного разведения сывороток на физиологическом растворе. Стартовое разведение сывороток: 1:10. Согласно международным стандартам отличия в $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{4}$ гомологичного титра не являются значимыми, дрейф-варианты отличаются от эталонных штаммов на $\frac{1}{8}$ - $\frac{1}{16}$ гомологичного титра.

Таблица 3.9. Сравнительные данные по РТГА вирусов гриппа А(Н1N1)рdм09 с крысиными и хорьковыми антисыворотками, обратные гомологичные титры антисывороток.

№	Вирусы	А/Калифор- ния/ 7/09	А/Калифор ния/ 7/09	А/Крайст- черч/ 16/10	А/Крайст- черч/ 16/10	А/СПб/ 27/11	А/СПб/ 27/11	А/Гонконг/ 5659/12	А/Гонконг/ 5659/12
		хорьковая (т. 1280)	крысиная (т. 640)	хорьковая (т. 5120)	крысиная (т. 640)	хорьковая (т. 640)	крысиная (т. 320)	хорьковая (т. 5120)	крысиная (т. 320)
1	А/Калифорния/7/09	1280	640	640	160	1280	320	1280	320
2	А/Крайстчерч/16/10	1280	320	5120	640	2560	160	5120	80
3	А/С.-Петербург/27/11	1280	320	320*	160	640	320	1280	160
4	А/Гонконг/5659/12	1280	320	640	160	1280	320	5120	320
5	А/С.-Петербург/202/09	2560	640	2560	640	2560	640	5120	320
6	А/С.-Петербург/204/09	640	160	160*	160	320	40*	640	80
7	А/С.-Петербург/5/09	1280	640	640	320	640	160	1280	320
8	А/Воронеж/2/09	1280	640	640	160	1280	160	2560	320
9	А/Мурманск/1/11	640	320	320*	160	320	160	640	160
10	А/С.-Петербург/45/11	640	320	640	160	1280	320	5120	160
11	А/С.-Петербург/123/11	1280	640	640	640	1280	320	5120	320
13	А/Екатеринбург/10/12	320	640	160*	160	80*	320	160*	320
14	А/Калининград/3/13	1280	320	640	160	1280	320	5120	160
15	А/С.-Петербург/1/13	640	320	320*	160	640	320	1280	160
17	А/С.-Петербург/26/13	640	320	320	80	640	160	1280	160

*- значимые отличия между результатами РТГА, полученными для хорьковых и крысиных антисывороток, по критерию Вилкоксона при уровне значимости $p = 0,05$

крысиная антисыворотка нейтрализовала данный вирус лишь до 1/8 гомологичного титра. При этом все эти вирусы были подобны эталонному штамму А/Калифорния/07/09 независимо от видовой принадлежности используемой сыворотки.

В целом можно заключить, что представленные результаты позволяют сделать вывод о целесообразности применения крысиных антисывороток в антигенном анализе вирусов гриппа человека А(Н1N1)рdm09, поскольку они дают результаты, сопоставимые с таковыми для хорьковых антисывороток. Наблюдаемые отличия являются принципиальными для трактовки результата в редких случаях, а использование широкой панели сывороток позволяет нивелировать эти различия. В этой связи дальнейший анализ антигенных свойств вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09 проводился с использованием только крысиных антисывороток.

3.3.2 Антигенный анализ вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09 2009-2013 гг. выделения

Антигенный анализ российских изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации с использованием крысиных поликлональных антисывороток, полученных к референс-вирусам, а также актуальным эпидемическим штаммам 2009-2013 гг. выделения.

В сезон 2009-2010 гг. все протестированные вирусы были однородны по своим антигенным свойствам и реагировали с диагностической гипериммунной овечьей антисывороткой А(Н1N1)рdm09, полученной из ВОЗ, до гомологичного титра. Такой же спектр реагирования вирусов этого сезона был отмечен и при постановке РТГА с крысиными антисыворотками к вирусам А(Н1N1)рdm09 А/Калифорния/07/09 и А/Санкт-Петербург/56/09. Большинство изолятов, протестированных в сезоне 2009-2010 гг. реагировали с указанными антисыворотками до 1 – 1/4 гомологичного титра. Важно отметить, что вирусы, выделенные из секционных материалов, не отличались по антигенным характеристикам от таковых, выделенных из мазков от больных. Только два

выделенных штамма можно отнести к дрейф-вариантам штамма А/Калифорния/07/09, поскольку они реагировали с соответствующей антисывороткой до 1/8 гомологичного титра – это штаммы А/Астрахань/60/09 и А/Белгород/6/09. Результаты РТГА представлены в таблице 3.2, где указаны репрезентативные штаммы. Сводные таблицы РТГА для сезонов 2009-2013 гг. приведены в приложении.

Уже спустя несколько месяцев после начала пандемии в мире было установлено, что в сыворотках людей пожилого возраста присутствовали антитела, способные частично нейтрализовать пандемический вирус А(Н1N1)pdm09. Это говорило о родстве нового возбудителя со «старыми» вирусами гриппа свиней и людей подтипа А(Н1N1), что и было подтверждено генетически. В этой связи представлялось интересным протестировать выделенные штаммы в РТГА с антисыворотками, полученными к вирусам «классического» гриппа свиней А/свинья/Айова/15/30, А/свинья/США/1976/31, А/свинья/Гонконг/1/74, А/свинья/Англия/195852/92, 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. Для сравнения были взяты две антисыворотки, полученные к вирусам гриппа свиней антигенно и генетически неродственным вирусам «классического» гриппа: А/свинья/Англия/195852/92 (Н1N1) и А/свинья/Англия/438207/94 (Н1N2).

Интересно, что выделенные штаммы реагировали с антисыворотками к штаммам 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

Таблица 3.10. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг. (Репрезентативные штаммы)

№	Вирусы гриппа	Диagn. сыв-ка ВОЗ Н1N1v Lot. FR-188	Крысиные антисыворотки к вирусам гриппа		Нормальные лошадиные сыворотки с.40к.596	
			А/Калифорния/07/09	А/С.Петербург/56/09	56°C 30 мин.	80°C 60 мин.
1	А/Айова/15/30	5120	10	10	< 10	< 10
2	А/Свинья/1976/31	5120	10	20	< 10	< 10
4	А/Нью-Джерси/8/76	5120	80	160	< 10	< 10
5	А/Калифорния/07/09	5120	640	320	< 10	< 10
6	А/С.Петербург/56/09	5120	640	640	> 1280	> 1280
7	А/С.Петербург/5/09	5120	640	640	< 10	< 10
8	А/С.Петербург/44/09	2560	320	320	< 10	< 10
9	А/С.Петербург/130/09	5120	640	640	1280	> 1280
10	А/С.Петербург/184/09	1280	160	160	1280	> 1280
11	А/С.Петербург/204/09	2560	160	320	1280	> 1280
12	А/С.Петербург/22/10	2560	160	320	1280	> 1280
13	А/Белгород/3/09*	1280	320	320	1280	> 1280
14	А/Белгород/6/09	1280	80	160	< 10	< 10
15	А/Вологда/6/09	2560	320	320	< 10	< 10
16	А/Астрахань/60/09	1280	80	160	< 10	< 10
17	А/Воронеж/17/09	2560	640	640	< 10	< 10
18	А/Омск/22/09	1280	640	640	640	> 1280
19	А/Калининград/2/09	2560	320	320	< 10	< 10
20	А/Хабаровск/59/09	2560	640	320	20	80
21	А/Чита/10/09*	1280	320	320	< 10	< 10
22	А/Воронеж/4/09*	2560	320	320	< 10	< 10

Здесь и далее: антигенный анализ российских изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации с использованием крысиных поликлональных антисывороток и эритроцитов кур (0,5%), полученных к референс-вирусам, а также актуальным эпидемическим штаммам 2009-2013 гг. выделения. Приведенные значения в таблице являются обратными титрами в РТГА с соответствующими антисыворотками. *-вирусы, выделенные из секционных материалов

подтверждается в РТГА. Как и следовало ожидать антисыворотки, полученные к вирусам А/свинья/Англия/195852/92 (Н1N1) и А/свинья/Англия/438207/94 (Н1N2), не нейтрализовали ни вирусы «классического» гриппа свиней, ни вирусы пандемического гриппа 2009 г., что подтверждает их принципиальное антигенное отличие от этой группы исследуемых вирусов. Результаты данной РТГА с указанием наиболее репрезентативных штаммов приведены в таблице 3.11.

В последовавший сезон 2010-2011 гг. вирусы пандемического гриппа вновь активно циркулировали на территории нашей страны, однако, несмотря на первую волну пандемии и массово проведенную иммунизацию против вирусов пандемического гриппа, штаммы, выделенные в данный сезон не претерпели сколько-нибудь значимых изменений антигенных характеристик. Большинство изученных изолятов реагировало с крысиными антисыворотками к вирусам А(Н1N1)рdm09 А/Калифорния/07/09, А/Санкт-Петербург/56/09 и новым референс-вирусом А/Южная Каролина/20/10 до 1-1/4 гомологичного титра. Хотя в мире были зарегистрированы дрейф-варианты вируса А/Калифорния/07/09, возникшие вследствие замены в 154/155 положениях молекулы HA1, их количество было незначительным. Стоит отметить, что генетическое разнообразие вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09 спустя два года активной циркуляции среди населения было уже велико и на сентябрь 2011 г. сотрудничающий центр ВОЗ в Лондоне выделял 8 генетических групп (см. литобзор). Однако антигенного разнообразия среди всех протестированных изолятов не наблюдалось. Даже использование антисывороток к новым референс-штаммам А/Южная Каролина/20/2010 и А/Гонконг/2121/2010 не давало возможности вычленить или обособить антигенно значимые группы вирусов А(Н1N1)рdm09. Вирусы, выделенные из секционных материалов, также были антигенно подобны референс-вирусам и реагировали с антисыворотками до 1/2-1/4 гомологичного титра. Данные РТГА представлены в таблице 3.12.

Сезон 2011-2012 гг был отмечен практически полным отсутствием циркуляции вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09 на территории России, поскольку в этот эпидемический период большинство выделяемых вирусов гриппа А относились к подтипу А(Н3N2). За этот период нами было получено 2 штамма вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09 из Екатеринбурга, чьи антигенные характеристики не отличались от изолятов предыдущих лет: оба вируса были антигенно подобны референс-вирусу А/Калифорния/07/09 и его более поздним разновидностям А/Южная Каролина/20/2010 и А/Гонконг/2121/2010.

Таблица 3.11. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг.

(Репрезентативные штаммы).

Вирусы гриппа	Крысиные антисыворотки к вирусам гриппа								
	А/свинья/ Айова/ 15/30	А/Свинья/ /США/ 1976/31	А/свинья/ Гонконг/ 1/74	А/свинья/ Англия/ 117316/86	А/свинья/ Англия/ 195852/92	А/свинья/ Англия/ 438207/94	А/Нью- Джерси/ 8/76	А/Калифор- ния/07/09	А/С.Петер- бург/ 56/09
А/свинья/Айова/15/30	640	320	320	10	10	<	40	10	20
А/свинья/США/ 1976/31	640	640	640	320	320	<	160	40	40
А/свинья/Гонконг/ 1/74	160	80	1280	640	80	20	320	160	160
А/свинья/Англия/ 117316/86	80	80	640	640	40	<	320	640	320
А/свинья/Англия/ 195852/92	20	160	640	160	640	<	80	40	40
А/свинья/Англия/ 438207/94	<	<	<	<	<	1280	<	<	<
А/Нью-Джерси/8/76	80	80	640	320	40	<	320	160	160
А/Калифорния/07/09	80	80	640	320	40	<	160	640	320
А/С.Петербург/56/09	160	80	640	320	40	<	160	640	640
А/С.Петербург/5/09	80	80	640	160	20	<	160	640	640
А/С.Петербург/44/09	80	40	640	320	20	<	80	320	320
А/С.Петербург/130/09	160	80	320	160	20	<	160	640	640
А/С.Петербург/184/09	80	40	320	320	20	<	80	160	160

Продолжение таблицы на следующей стр.

Крысиные антисыворотки к вирусам гриппа

Вирусы гриппа	Крысиные антисыворотки к вирусам гриппа								
	А/свинья/ Айова/ 15/30	А/Свинья/ /США/ 1976/31	А/свинья/ Гонконг/ 1/74	А/свинья/ Англия/ 117316/86	А/свинья/ Англия/ 195852/92	А/свинья/ Англия/ 438207/94	А/Нью- Джерси/ 8/76	А/Калифор- ния/07/09	А/С.Петер- бург/ 56/09
А/свинья/Айова/15/30	640	320	320	10	10	<	40	10	20
А/св/США/1976/31	640	640	640	320	320	<	160	40	40
А/св/Гонконг/1/74	160	80	1280	640	80	20	320	160	160
А/св/Англ/117316/86	80	80	640	640	40	<	320	640	320
А/св/Англ/195852/92	20	160	640	160	640	<	80	40	40
А/св/Англ/438207/94	<	<	<	<	<	1280	<	<	<
А/Нью-Джерси/8/76	80	80	640	320	40	<	320	160	160
А/Калифорния/07/09	80	80	640	320	40	<	160	640	320
А/С.Петербург/56/09	160	80	640	320	40	<	160	640	640
А/Астрахань/60/09	40	40	640	160	20	<	40	80	160
А/Воронеж/17/09	80	40	320	320	20	<	160	640	640
А/Омск/22/09	80	80	640	160	20	<	160	640	640
А/Калининград/2/09	40	40	320	320	20	<	160	320	320
А/Хабаровск/59/09	80	40	320	160	20	<	160	640	320
А/Чита/10/09*	40	20	320	320	20	<	160	320	320
А/Белгород/6/09	40	40	320	320	20	<	40	80	160
А/С.Петербург/204/09	80	80	640	160	20	<	160	160	320
А/С.Петербург/22/10	40	40	320	320	20	<	80	160	320
А/Белгород/3/09*	80	40	640	160	20	<	160	320	320

Таблица 3.12. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2010-2011 гг. (Репрезентативные штаммы)

Вирусы гриппа	Диagn. сыв-ка ВОЗ Н1N1v Lot. FR-188	Крысиные антисыворотки к вирусам гриппа			
		А/Калифорния/07/2009	А/С.Петербург/56/2009	А/Южная Каролина/20/2010	А/Гонконг/2121/2010
А/Калифорния/07/09	5120	640	320	640	160
А/С.Петербург/56/09	5120	640	640	640	160
А/Ю. Каролина/20/10	5120	640	640	1280	320
А/Гонконг/2121/10	5120	640	640	640	640
А/С.-Петербург/1/11	5120	320	320	1280	320
А/С.-Петербург/9/11	2560	320	320	1280	320
А/С.-Петербург/15/11	5120	640	640	1280	320
А/С.-Петербург/27/11	1280	640	640	1280	320
А/С.-Петербург/39/11	2560	640	640	1280	160
А/С.-Петербург/45/11	2560	160	160	320	320
А/С.-Петербург/90/11	1280	640	640	1280	320
А/С.-Петербург/123/11	1280	640	640	1280	320
А/С.-Петербург/142/11	2560	640	320	1280	320
А/С.-Петербург/100/11*	1280	320	640	640	160
А/С.-Петербург/108/11	2560	640	640	1280	160
А/С.-Петербург/109/11	1280	160	80	320	320
А/С.-Петербург/166/11	2560	640	640	1280	320
А/С.-Петербург/170/11	2560	320	320	1280	320
А/Калининград/4/11	1280	640	640	1280	320
А/Ставрополь/4/11	2560	640	640	1280	160
А/Мурманск/1/11	5120	320	320	640	160
А/Чита/1/11	2560	640	320	1280	160
А/Чита/8/11	5120	640	320	1280	320
А/Краснодар/16/11	1280	640	320	1280	320
А/Калуга/1/11*	2560	320	320	640	320
А/Воронеж/21/11	2560	320	320	640	160
А/Москва/24/11	1280	320	320	640	160
А/Москва/5/11	1280	320	160	320	160
А/Астрахань/1/11	2560	160	80	160	160

Несмотря на низкую активность вирусов пандемического гриппа 2009 г. в предыдущий сезон, *эпидемический сезон 2012-2013 гг.* характеризовался активной социркуляцией вирусов гриппа А (H1N1)pdm09 и (H3N2). Возвращение А(H1N1)pdm09 в циркуляцию среди населения, однако, не привело к формированию выраженной антигенной гетерогенности среди данного подтипа вирусов гриппа. Хотя в мире детектировались дрейф-варианты А/Калифорния/07/09 и их количество составляло 8-10% от общего числа антигенно охарактеризованных вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 [WHO, 2013], нам не удалось зарегистрировать группы вирусов, антигенно отличных от эталонного штамма А/Калифорния/07/09 и в данном сезоне. Результаты РТГА приведены для репрезентативных штаммов в таблице 3.13. Хотя современные изоляты 2013 гг. выделения стали слабее взаимодействовать с антисыворотками, полученными к вирусам А/Гонконг/2121/2010 и А/Крайстчерч/16/10 (до $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{8}$ гомологичного титра), в целом, все штаммы 2012-2013 гг. выделения эффективно нейтрализовались сыворотками, полученными против эталонного вируса А/Калифорния/07/09, а также против современного репрезентативного штамма А/Санкт-Петербург/27/11.

Обобщая данные вирусологических исследований можно констатировать, что в эпидемические сезоны 2009-2013 гг. в России, как и в мире, активно циркулировали пандемические вирусы А(H1N1)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.

Несмотря на выраженную антигенную однородность российских изолятов А(H1N1)pdm09 за весь изученный период 2009-2013 гг., при постановке РТГА была отмечена интересная особенность значительной части выделенных пандемических штаммов: это способность реагировать с высокими титрами с прогретой до 56°C и до 80°C нормальной лошадиной сывороткой, в то время как все выделенные ранее штаммы свиного происхождения были ингибиторо-резистентными (см. табл. 3.10).

Таблица 3.13. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2012-2013 гг. (Репрезентативные штаммы)

Вирусы гриппа	Диagn. сыв-ка ВОЗ Н1N1pdm Lot. FR-188	Крысиные антисыворотки к вирусам гриппа						
		А/Калифорния/07/09	А/Санкт-Петербург/56/09	А/Южная Каролина/20/10	А/Львов/ N6/09	А/Гонконг/2121/10	А/Крайстчерч/16/10	А/Санкт-Петербург/27/11
А/Калифорния/07/09	5120	640	320	640	160	160	160	320
А/С.-Петербург/56/09	5120	640	640	640	160	160	160	160
А/Ю. Каролина/20/10	5120	640	640	1280	320	320	320	320
А/Львов/N6/09	5120	160	160	320	640	320	320	80
А/Гонконг/2121/10	5120	320	320	640	160	640	320	80
А/Крайстчерч/16/10	5120	640	320	640	160	320	1280	160
А/С.-Петербург/27/11	5120	640	640	1280	80	160	320	320
А/С.-Петербург/1/13	1280	640	320	1280	160	160	160	320
А/С.-Петербург/3/13	2560	320	320	640	80	80	160	160
А/С.-Петербург/5/13	1280	320	320	640	160	160	160	320
А/С.-Петербург /21/13	1280	1280	640	1280	320	320	320	320
А/С.-Петербург/135/13	1280	160	320	320	80	80	160	80
А/Калининград/3/13*	1280	640	320	1280	160	160	160	320
А/С.-Петербург /70/13	2560	640	640	1280	80	80	640	160
А/С.-Петербург/133/13	1280	640	640	640	80	160	320	160
А/Самара/105/13	1280	320	640	1280	160	160	160	80
А/Самара/83/13	1280	640	640	640	160	160	160	160
А/Екатеринбург/2/13	1280	640	320	640	160	160	160	80
А/Екатеринбург /11/13	1280	320	320	1280	160	160	160	80

Российские изоляты 2009-2013 г. делились в этом отношении на две четкие и примерно равные группы: одни не реагировали с лошадиной сывороткой, другие же реагировали с высокими титрами (до 1:1280 и выше). Данная биологическая особенность обнаружена как у вирусов, выделенных от больных, так и у штаммов, изолированных из секционного материала. Выявить причины, с которыми связана эта особенность, не входило в задачи текущего исследования, однако можно констатировать, что это одно из ярких отличий, позволяющих разделить российские изоляты на группы ингибиторо-чувствительных и ингибиторо-резистентных штаммов.

3.3.3 Изучение антигенных свойств вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 с использованием крысиных антисывороток, полученных к современным вирусам гриппа A(H1N1)pdm09, выделенным на куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK

В последние несколько лет отмечены случаи, когда антисыворотки к эталонным штаммам и антигенно близкие варианты вирусов гриппа плохо взаимодействуют в РТГА. Эта особенность также отмечалась коллегами из центра ВОЗ по гриппу в Лондоне (WHO, сентябрь 2010), и особенно ярко выражена для вирусов гриппа A(H3N2). Причиной этого явления считают различия в системах выделения и накопления вируса для последующей иммунизации. В частности, вирусы гриппа подтипа A(H3N2), выделенные на клетках MDCK, очень слабо нейтрализуются референс-антисывороткой, полученной к эмбриональному варианту вируса, в то время как сыворотка, полученная к MDCK-варианту того же вируса нейтрализует эти антигены до гомологичного титра. Для изучения этого феномена на модели современных российских изолятов вирусов пандемического гриппа 2009 г., нами было проведено изучение антигенных свойств вирусов A(H1N1)pdm09 разных лет выделения, изолированных параллельно в 2-х клеточных системах - куриных эмбрионах (КЭ-вариант) и клеточной культуре MDCK (MDCK -вариант). Для проведения антигенного анализа в РТГА были использованы крысиные антисыворотки, полученные к КЭ и MDCK вариантам

вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Для тестирования использовали два штамма вирусов гриппа – А/Санкт-Петербург/5/09 и А/Санкт-Петербург/26/13, выделенные в параллели на куриных эмбрионах и клетках MDCK, и полученные к ним крысиные антисыворотки, а также две антисыворотки, полученные к современным вирусам гриппа А/Гонконг/5659/12, выделенном на культуре клеток MDCK и А/Калининград/4/11, выделенном на куриных эмбрионах. Помимо перечисленных антигенов для анализа были отобраны вирусы разных лет выделения, система выделения приведена за названием вируса.

В результате проведения 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 (табл. 3.14).

Однако наблюдались и отличия. Так, в случае изолята А/Санкт-Петербург/204/09, выделенного на КЭ, антисыворотка, полученная к репрезентативному штамму 2009 г. выделения А/Санкт-Петербург/5/09 (КЭ - вариант) нейтрализует этот вирус до $\frac{1}{2}$ гомологичного титра, в то время как MDCK-вариант сыворотки к этому вирусу взаимодействует со штаммом А/Санкт-Петербург/204/09 лишь до $\frac{1}{8}$ гомологичного титра. Подобная же ситуация наблюдается и для вируса А/Астрахань/35/11. Стоит отметить, что оба эти вируса несут мутации в районе 154/155 положения в молекуле HA1, что будет обсуждаться в следующих разделах данного исследования. Возможно, что антисыворотка, полученная к MDCK-варианту вируса А/Санкт-Петербург/5/09 направлена именно на этот эпитоп в молекуле HA, в отличие от антисыворотки, полученной к эмбриональному варианту данного штамма, что и приводит к дифференциации результатов в РТГА.

Таблица 3.14. Антигенный анализ вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с использованием поликлональных крысиных антисывороток, полученных к эмбриональным (КЭ) и клеточным (МДСК) вариантам вирусов.

Вирусы гриппа	Крысиные антисыворотки к вирусам гриппа					
	А/СПб/ 5/09 МДСК	А/СПб/ 5/09 КЭ	А/СПб/ 26/13 МДСК	А/СПб/ 26/13 КЭ	А/НК/ 5659/12 МДСК	А/Кал-д/ 4/11 КЭ
А/С.Петербург/5/09 МДСК	320	640	640	320	320	320
А/С.Петербург /5/09 КЭ	320	640	1280	640	640	640
А/С.Петербург /26/13 МДСК	160	320	640	640	320	320
А/С.Петербург /26/13 КЭ	160	320	640	640	160	320
А/НК/5659/12 МДСК	160	320	320	320	320	320
А/Калининград/ 4/11 КЭ	160	640	320	320	320	640
А/С.Петербург/202/09 КЭ	320	640	640	640	320	640
А/ С.Петербург /204/09 КЭ	40	320	80	80	80	160
А/Воронеж/2/09 КЭ	160	320	320	320	320	320
А/Мурманск/1/11 КЭ	80	320	160	320	160	320
А/ С.Петербург/45/11 МДСК	160	320	320	320	160	320
А/ С.Петербург /123/11 МДСК	160	640	640	640	320	640
А/Астрахань/35/11 МДСК	80	640	160	80	80	320
А/Екатеринбург/10/12 МДСК	160	320	320	640	320	640
А/Калининград/3/13 КЭ	80	320	320	320	160	320
А/ С.Петербург /1/13 КЭ	160	320	320	320	160	320

3.3.4 Антигенные карты для вирусов гриппа A(H1N1)pdm09

Метод антигенной картографии был разработан для наглядного представления результатов РТГА, являющейся до настоящего времени основным инструментом надзора за антигенными характеристиками вирусов гриппа. Метод основан на использовании многомерных математических моделей, которые позволяют получить двумерное или трехмерное изображение – антигенную карту – представляющую графическое отображение результатов математической обработки таблиц РТГА. Антигенная карта дает возможность в общем оценить эволюционные тенденции изменчивости вирусов. Преимуществом данного метода является простота и наглядность представляемых данных, т.к. на одной карте можно отобразить до нескольких сотен разных антигенов и несколько десятков сывороток, в то время как табличные результаты РТГА занимают большой объем печатных страниц. Недостатком данного метода является необходимость использования большого количества антигенов, среди которых должны быть как минимум несколько эволюционно дистанцированных друг от друга антигенов для получения достоверных результатов.

Антигенная карта отображает числовую разницу во взаимодействии вирусов с антисыворотками в виде расстояния на карте. Один квадрат карты соответствует разнице в РТГА равной $\frac{1}{2}$ гомологичного титра. При этом условно принято, что антисыворотки изображаются в виде квадратов, гомологичные антигены – в виде овалов, а тестируемые антигены - в виде кругов.

В ходе исследования для анализа эволюционной изменчивости современных изолятов вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг. был применен метод антигенной картографии.

Для построения антигенных карт были использованы данные РТГА, содержащие 128 антигенов и 7 антисывороток. Результаты представлены на рисунке 3.10. Можно видеть, что антигенно гомогенные вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 сгруппированы в единое «пятно» вирусов 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 небольшую 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.

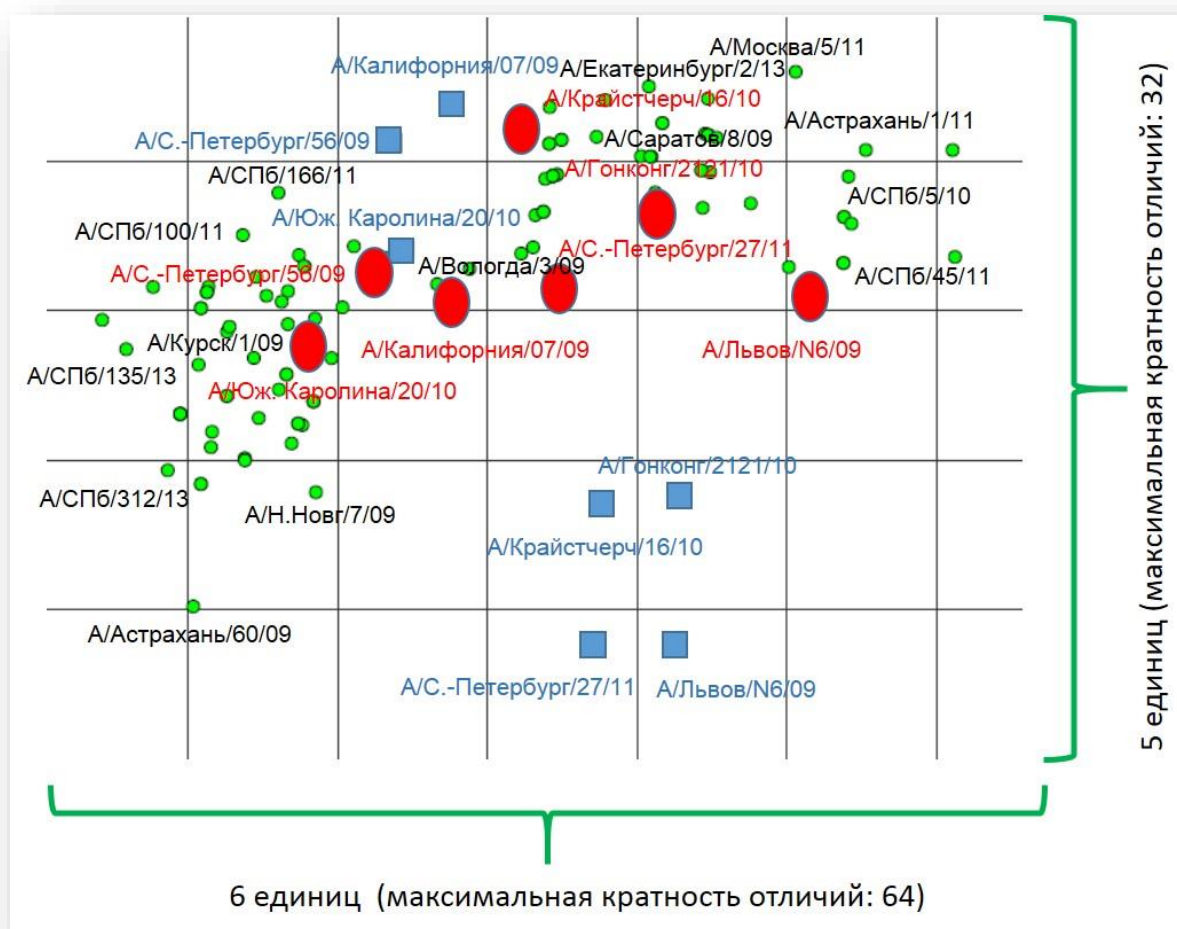


Рисунок 3.10. Антигенная карта для вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг.

Поскольку большинство вирусов пандемического гриппа антигенно однородны, это приводит к получению карты с низким разрешением (5 единиц), поэтому для увеличения масштаба карты и получения более наглядных и

достоверных карт в анализ также были включены антигены и сыворотки «классического» гриппа свиней, а также вирусов гриппа, имеющих с ними эволюционное родство. Результаты данного картирования представлены на рисунке 3.11. На данной карте видно, что вирусы гриппа свиней 1930-х годов выделения эволюционно удалены от всех вирусов пандемического гриппа. При этом вирусы А/Нью Джерси/8/76 и более современный вирус «классического» гриппа свиней А/свинья/Англия/117316/86 эволюционно отдалены от вирусов пандемического гриппа на гораздо меньшее расстояние. Вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 сгруппированы в кластер вокруг современных эталонных и репрезентативных штаммов, но при этом на карте видны и изоляты, демонстрировавшие в РТГА антигенную неоднородность и потому расположенные в некотором отдалении от общего кластера, как, например, А/Санкт-Петербург/204/09.

3.3.5 Заключение

Антигенный анализ вирусов А(Н1N1)pdm09, выделенных за пятилетний период, показывает, что все они в большинстве своем антигенно однородны. Обнаруживаемые различия при взаимодействии с сыворотками разных способов получения и разной хозяйской принадлежности, возможно, могут указывать на постепенно возникающую, но пока еще антигенно невыраженную, неоднородность вирусной популяции начального периода циркуляции А(Н1N1)pdm09. Весьма вероятно, что у вирусов более позднего периода эта неоднородность будет более выражена. Результаты антигенного картирования подтверждают данные, полученные в РТГА.

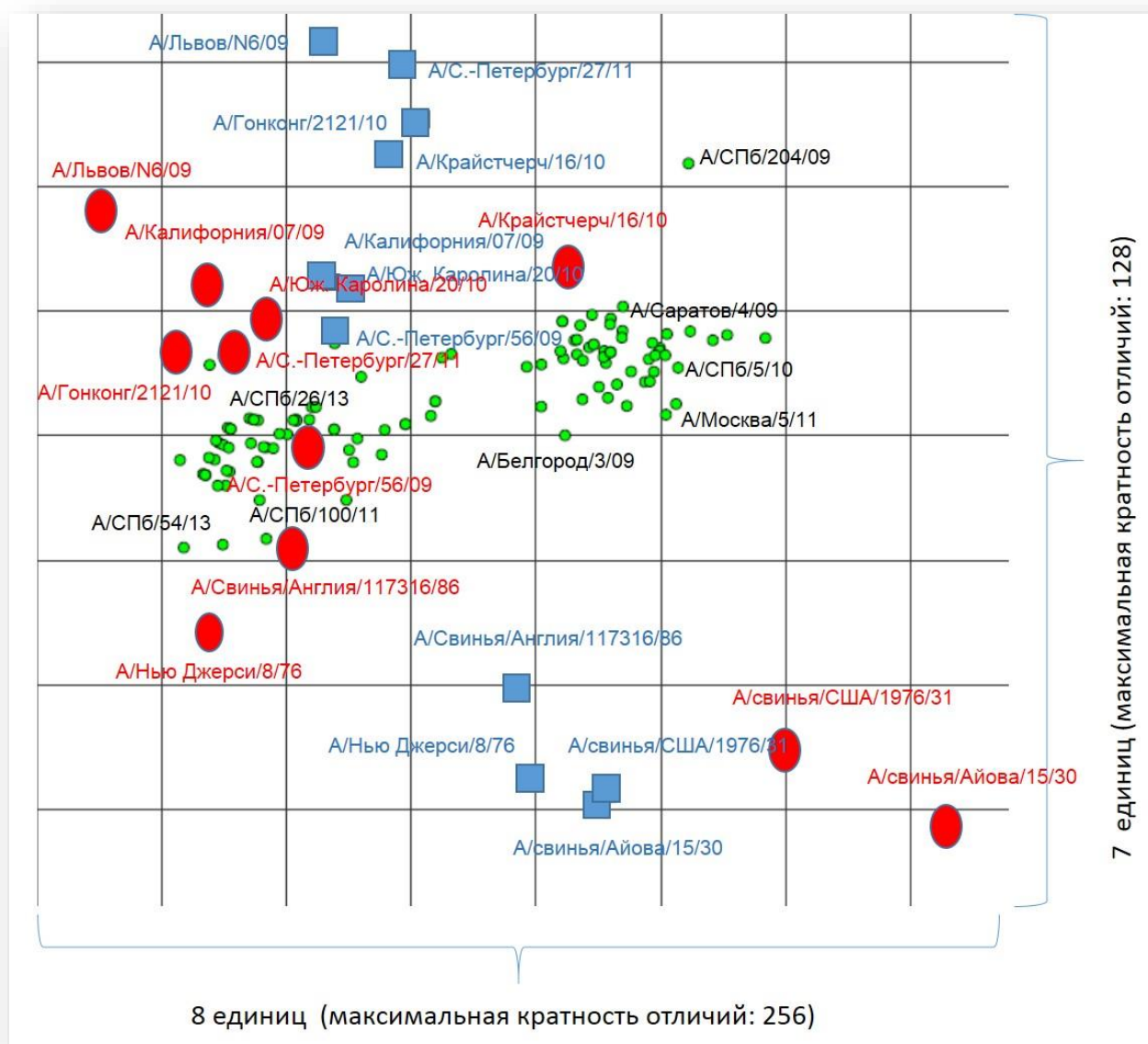


Рисунок 3.11. Антигенная карта для вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг. с добавлением антигенов и антисывороток, родственных «классическому» гриппу свиней A(H1N1).

3.4. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1)pdm09, ОПРЕДЕЛЯЕМОЕ ПОВЕРХНОСТНЫМИ БЕЛКАМИ ВИРУСА ГРИППА

3.4.1. Анализ аминокислотного состава НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 гг.

Высокая изменчивость вирусов гриппа А во многом обусловлена постоянными изменениями в антигенно-значимых участках молекулы НА. Однако, как отмечалось в разделе 3.1.3, антигенные свойства большинства вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 за весь исследуемый период оставались относительно однородными, и лишь некоторые отдельные изоляты могли быть выделены по антигенным свойствам в РТГА. При этом, анализ аминокислотного состава молекулы НА вирусов пандемического гриппа 2009 г. выявил достаточную гетерогенность. Известно, что аминокислотные замены в белках имеют различную значимость в зависимости от их местоположения и физико-химических свойств аминокислот. Значимость аминокислотных замен оценивалась нами с учетом следующих их характеристик:

1. нахождение в пределах или вне антигенно важных доменов;
2. появление или потеря потенциальных сайтов гликозилирования;
3. изменение физико-химических свойств аминокислот (заряда, полярности, размера бокового радикала, нарушение структурных участков в белке за счет встраивания/утраты пролина)

В эпидемический 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, которые были зарегистрированы на североамериканском еще в начале весны 2009 г. В таблице 3.15 представлено сравнение аминокислотных последовательностей НА эталонных и эпидемических российских вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09

Таблица 3.15. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг.

Эпидемический сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции																		
		83	87	97	140	154	155	183	191	203	222	223	235	272	283	297	321	374	451	488
	Антигенные сайты/рецептор-связывающий сайт	С _b			Ca ₂	S _b					PCC		H1 _c							
2009-2010	А/Калифорния/04/09	P	N	D	G	K	G	S	L	S	D	Q	E	V	K	P	I	E	S	K
	А/Калифорния/07/09	P	N	D	G	K	G	S	L	S	D	Q	E	V	K	P	I	E	S	K
	А/Львов/№6/09	S					E			T										
	А/С.-Петербург/5/09	S								T	E						V			
	А/С.-Петербург/35/09	S								T	G									
	А/С.-Петербург/48/09	S	K							T										
	А/С.-Петербург/99/09	S						I		T	E						V			
	А/С.-Петербург/204/09	S				E				T	G			F						
	А/Белгород/1/09*	S								T							V	K		
	А/Белгород/5/09	S								T							V	K		
	А/Воронеж/1/09*	S			E					T	G									
	А/Псков/2/09*	S								T	G			F						
	А/Нижний Новгород/1/09*	S								T	G									
	А/Нижний Новгород/2/09*	S								T	G									E
	А/Курск/1/09*	S								T	G									
	А/Чита/1/09	S								T		R					V			
	А/Калининград/1/09	S								T	E	R	D			S	V			
	А/Саратов/3/09*	S								T	N									
	А/Саратов/8/09*	S								T	G									
	А/Белгород/2/10*	S								T	G		D			S	V			
А/Петрозаводск/2/09	S								T		R			E						

2009-2010 гг. выделения. Эталонные штаммы выделены в таблице жирным шрифтом и голубым фоном. Прежде всего, обращают внимание 2 замены, присутствующие у всех проанализированных штаммов: замена пролина на серин в 83 положении и серина на треонин в 203 положении. Отметим, что S203T, по-видимому, является одной из самых первых замен в молекуле HA, зарегистрированных в мире, отличающих эталонные штаммы A/Калифорния/04/09 и A/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 A(H1N1)pdm09, зарегистрированных до сих пор. Хотя она не несет принципиального изменения в структуре белковой молекулы, т.к. обе аминокислоты являются нейтральными и не несут существенных по размеру боковых групп, по всей видимости, вирусы, содержащие именно треонин в 203 положении HA1 обладают неким селективным преимуществом в человеческой популяции, что способствует сохранению этой мутации. В отличие от этой замены, смена пролина в 83 положении на серин была зарегистрирована в мире у вирусов чуть позднее, в период после лета 2009 г., и связана с давлением иммунного ответа. Эта мутация расположена в антигенном сайте С_b, расположенном на боковой поверхности молекулы HA1 в удалении от всех остальных антигенных сайтов, локализованных в структуре HA подтипа H1 (Shen J. et al., 2009). Интересно отметить, что у «старых» вирусов гриппа свиней A/свинья/Айова/15/30 и A/свинья/США/1976/31, также как и у вирус гриппа A/Нью Джерси/8/76 в этом положении также находится серин, а пролин появляется у вирусов гриппа A(H1N1), вернувшихся в циркуляцию в 1977 г., таких как A/СССР/90/1977 (см. табл.3.18), и «сохраняется» у ранних штаммов A(H1N1)pdm09, однако впоследствии происходит быстрая реверсия пролина на серин, который регистрируется у всех штаммов, выделенных с сентября 2009 г по настоящее время.

В остальных позициях аминокислотные замены были зарегистрированы лишь у отдельных штаммов. Важными заменами, влияющими на антигенные свойства

вирусов, является вариабельный участок в 154-155 положении, расположенный в антигенной сайте S_b, одном из основных и антигенно наиболее значимых сайтов на верхушке молекулы HA. Здесь отмечены замены K154E и G155E, которые приводят к возникновению вариантов вирусов, антигенно отличных от эталонных штаммов. Таков, например, A/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 получают широкое распространение.

В непосредственной близости от рецептор-связывающего сайта в положениях 222 и 223 уже на самых ранних стадиях циркуляции вирусов A(H1N1)pdm09 обнаруживается гетерогенность по составу аминокислот. Однако поскольку значимость этих мутаций велика, их роли и распространению будет посвящен следующий специальный раздел.

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, несущими замены N125D, V94N, V250A (как например A/Крайстчерч/16/2010), а другая содержит замены S128P, V199A, I295V, K163, P271S (подгруппа A/Гонконг/2213/2010). Все вирусы несут мутацию S203T. Российские изоляты конца 2010 г нельзя с точностью отнести к какой-либо из этих групп (см. табл. 3.16), однако известно, что 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: 1) A134T, S183P 2) R205K, I216V, V249L 3) S185T, S143G. Вирусы, несущие подобные аминокислотные замены, были зарегистрированы на территории России зимой и весной 2011 г.

Таблица 3.16. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции																								
		83	87	97	125	134	140	143	154	155	183	185	191	197	203	205	216	222	223	249	283	321	372	374	379	451
		С _b					Ca ₂		S _b					S _b					PCC							
2010-2011	<i>А/Калифорния/07/09</i>	P	N	D	N	A	G	S	K	G	S	S	L	A	S	R	I	D	Q	V	K	I	I	E	V	S
	<i>А/Крайстчерч/16/10</i>	S	N	D	D	A	G	S	K	G	S	S	L	A	S	R	I	N	Q	A	K	I	I	E	V	S
	<i>А/С-Петербург/20/10</i>	S													T				R			V				
	<i>А/С-Петербург/182/10</i>	S	K										I		T											
	<i>А/С-Петербург/25/11</i>	S			D										T							V		K		
	<i>А/С-Петербург/27/11</i>	S		N								T			T				R			V		K		N
	<i>А/С-Петербург/45/11</i>	S		N				E				T	I		T							V		K		N
	<i>А/С-Петербург/100/11*</i>	S										T		T	T				R			V		K		N
	<i>А/С-Петербург/109/11</i>	S		N											T	K	V	G		L		V		K		
	<i>А/С-Петербург/11/11</i>	S													T				N			V				
	<i>А/С-Петербург/174/11</i>	S		N								T			T				R			V		K		N
	<i>А/Воронеж/1/11*</i>	S		N											T	K	V			L		V		K		
	<i>А/Воронеж/21/11</i>	S			D										T							V		K		
	<i>А/Калуга/1/11*</i>	S		N								T			T				R			V	V	K		N
	<i>А/Мурманск/1/11</i>	S		N								T			T				G			V		K	L	N
	<i>А/Калининград/4/11</i>	S										T	I	T	T							V		K		N
	<i>А/Астрахань/1/11</i>	S		N											T	K	V			L		V		K		
	<i>А/Астрахань/35/11</i>	S			D										T				A			V		K		
	<i>А/Нижний Новгород/2/11</i>	S													T							V		K		
<i>А/Чита/8/11</i>	S				T									T							V		K			
<i>А/Москва/24/11</i>	S						G						T	T							V		K			

эпидемический сезон 2010-2011 гг

Так, выделилась небольшая группа вирусов, генетически подобных эталонному штамму А/Крайстчерч/16/2010 – А/Санкт-Петербург/25/11, А/Воронеж/21/11, А/Астрахань/35/11. Стоит отметить, что штамм А/Астрахань/35/11 обладал еще и нетипичной заменой в 222 положении D222A, что выражалось в отличии его антигенных свойств от большинства вирусов, выделенных в сезон 2010-2011 гг. Интересен «промежуточный» изолят А/Чита/8/11, обладающий заменой A134T, но при этом не несущий ещё характерных для более поздней группы замен S183P и D97N. При этом очень многие вирусы данного сезона несут замену D97N и S185T, что сближает их с третьей группой вирусов, зарегистрированных в мире в течение этого сезона, однако ни у кого из них не встречается замена S143G, характерная для группы в целом. При этом, именно эта мутация зарегистрирована для штамма А/Москва/24/11, который при этом не обладает больше ни одной из аминокислотных замен, характерной для какой-то из выделенных генетических групп.

Еще одной важной аминокислотной заменой, зафиксированной у большинства изолятов в этом сезоне, является замена 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 А(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 А(H1N1)pdm09, в некоторых из которых были и подгруппы. Эти группы и подгруппы представлены в таблице 3.17. 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 (без подразделений на подгруппы), 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.

Таблица 3.17. Генетические группы вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 по данным сотрудничающего центра ВОЗ в Лондоне на 2012-2013 гг.

№ группы	Характерные АК замены в НА	Референс-штамм
1		А/Калифорния/07/09
2	N31D, S162N, A186T	А/Чехия/32/11
3	A134T, S183P	А/Гонконг/3934/11
4	N125D	А/Крайстчерч/16/10
5	N97D, R205K, I216V, V249L	А/Астрахань/1/11
6а	H138R, V249L	А/Гонконг/5659/12
6б	K163Q, K283E, A256T, E499K	А/Стокгольм/15/13
6с	V234I, K283E, E499K	А/Эстония/76677/13
7	D97N, S143G, S185T, A197T	А/С.-Петербург/100/11
8	A186T, V272A	А/Гана/601/11

Вирусы, выделенные в данном эпидемическом сезоне в России, в большинстве своем принадлежали к генетической группе 6с, несущей характерные аминокислотные замены V234I, K283E, E499K (см. табл.3.18). Эта группа получила наиболее широкое распространение и в мире. Стоит отметить, что аминокислотные замены, характерные для этой группы, расположены вне известных антигенных сайтов и далеко отстоят от рецептор-связывающего сайта. Более того, мутация E499K находится в молекуле HA2, что по-видимому, может свидетельствовать о непрерывном процессе изменчивости возбудителя, связанного не только с избеганием иммунного ответа, но и с закреплением мутаций, дающих селективное преимущество для функционирования поверхностного белка, определяющего инфекционность вируса. Помимо генетической подгруппы 6с, был также зарегистрирован вирус из подгруппы 6b – А/Москва/18/2013, однако данный вирус был выделен от больного, прибывшего из Саудовской Аравии. Вирус, выделенный в начале сезона в Чите (А/Чита/8/12) принадлежит к генетической группе 3, ранее не регистрировавшейся в России. Особо стоит отметить вирус А/Санкт-Петербург/11/13, обладающий

заменами в антигенно-значимых областях S_a и S_b , но при этом не дававший антигенных отличий в РТГА от эталонных штаммов.

Таким образом, генетический анализ молекулы HA вирусов гриппа А(H1N1)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 HA не были антигенно значимыми, хотя многие из них локализованы в антигенных сайтах S_a , S_b , S_a , S_b и вблизи от рецептор-связывающего сайта. Для сравнения современных вирусов А(H1N1)pdm09 с вирусами «классического гриппа» свиней,

Таблица 3.18. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2010-2011 гг.

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции																						
		75	83	97	129	134	141	163	182	183	215	222	223	234	256	264	271	283	321	374	439	441	451	499
			С _б		Са			Са	Близ ко к PCC		PCC		С _б											
2012-2013	<i>А/Калифорния/07/09</i>	S	P	D	N	A	A	K	P	S	A	D	Q	V	A	G	P	K	I	E	D	N	S	E
	<i>А/Астрахань/1/11</i>	S	S	N	N	A	A	K	P	S	A	D	Q	V	A	G	P	K	V	K	D	N	S	E
	<i>А/С.-Петербург/27/11</i>	S	S	N	N	A	A	K	P	S	A	D	R	V	A	G	P	K	V	K	D	N	N	E
	<i>А/С.-Петербург/100/11</i>	S	S	D	N	A	A	K	P	S	A	D	Q	V	A	G	P	K	V	K	D	N	N	E
	<i>А/Чита/8/12</i>		S	N		T				P				V				K	V	E		K	S	E
	<i>А/С-Петербург/11/13</i>		S	N		T		I					R	I		D		E	V	K			N	K
	<i>А/С-Петербург/33/13</i>	P	S	N			T							I				E	V	K			N	K
	<i>А/С-Петербург/37/13</i>		S	N			T							I				E	V	K			N	K
	<i>А/С-Петербург/24/13</i>		S	N										V				E	V	K	N		N	K
	<i>А/С-Петербург/135/13</i>		S	N			T						R	I				E	V	K			N	K
	<i>А/С-Петербург/151/13</i>		S	N										I				E	V	K			N	K
	<i>А/Екатеринбург/9/13</i>		S	N							T			I				E	V	K			N	K
	<i>А/Екатеринбург/11/13</i>		S	N					Q					I				E	V	K			N	K
	<i>А/Калининград/3/13</i>		S	N	D								R	I				E	V	K			N	K
	<i>А/Киров/1/13*</i>		S	N								G		I				E	V	K			N	K
	<i>А/Н.Новгород/1/13*</i>		S	N					Q			G		I				E	V	K			N	K
	<i>А/Н.Новгород/2/13</i>		S	N									R	I				E	V	K			N	K
<i>А/Москва/18/13</i>		S	N				Q		P				I	T		S	E	V	K			N	K	

а также старыми вирусами А(Н1N1), приведена таблица 3.19. В ней на голубом фоне отмечены аминокислотные остатки, соответствующие таковым для эталонного вируса А/Калифорния/07/09. В то же время, как уже было отмечено, существуют определенные позиции в молекуле НА, где у современных вирусов А(Н1N1)pdm09 произошли реверсивные мутации, которые «сближают» их с вирусами прошлых лет. Такова реверсивная мутация Р83S, о которой шла речь выше, и D97N, обнаруживаемая у большинства современных вирусов А(Н1N1)pdm09. Интересна также смена неполярной незаряженной аминокислоты аланина в 224 положении, присутствующих у всех «старых» вирусов на полярную отрицательно заряженную глутаминовую кислоту, находящуюся в непосредственной близости от рецептор-связывающего сайта у всех современных А(Н1N1)pdm09. Еще одна реверсивная замена находится в фрагменте НА2 - Е499К, и сближает вирусы пандемического гриппа со штаммами, вернувшимися в циркуляцию в 1977 г. Основные аминокислотные отличия современных вирусов А(Н1N1)pdm09 от вирусов «классического» гриппа свиней представлены на рисунке 3.12 с использованием пространственных структур молекул НА для вирусов А/свинья/Айова/15/30 и А/Калифорния/07/09 из базы данных белковых структур PDB.

Таблица 3.19. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, в сравнении с эталонными

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции																					
		51	71	73	74	83	97	125	127	128	129	139	142	152	163	183	185	203	205	208	211	216	222
		С _б			С _{а2}					С _а					С _а								
1930-2013	<i>А/свинья/Айова/15/30</i>	Q	L	V	S	S	D	N	E	T	T	A	S	K	K	P	S	S	K	D	T	A	G
	<i>А/свинья/США/1976/31</i>	Q	L	V	S	S	D	N	E	T	T	A	S	K	K	P	S	S	K	Y	T	A	G
	<i>А/Нью Джерси/8/76</i>	H	L	V	S	S	N	D	E	T	N	A	N	K	K	P	S	S	K	N	K	A	G
	<i>А/СССР/90/77</i>	Q	F	K	K	P	D	K	N	V	T	K	S	E	K	S	I	S	N	N	T	E	G
	<i>А/Калифорния/07/09</i>	H	S	A	S	P	D	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	S	R	S	K	I	D
	<i>А/С.-Петербург/5/09</i>	H	S	A	S	S	D	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	T	R	S	K	V	E
	<i>А/С.-Петербург/27/11</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	K	S	T	T	R	S	K	V	D
	<i>А/С.-Петербург/100/11</i>	H	S	A	S	S	D	N	D	S	N	A	K	K	K	S	T	T	R	S	K	V	D
	<i>А/Астрахань/1/11</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	T	K	S	K	V	D
	<i>А/Белгород/2/10*</i>	H	S	A	S	S	D	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	T	R	S	K	V	G
	<i>А/Екатеринбург/11/13</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	I	S	T	T	R	S	K	V	D
	<i>А/Калининград/1/09</i>	H	S	A	S	S	D	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	T	R	S	K	V	E
	<i>А/Киров/1/13</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	K	S	T	T	R	S	K	V	G
	<i>А/Москва/18/13</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	Q	P	T	T	R	S	K	V	D
	<i>А/Мурманск/1/11</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	K	S	T	T	R	S	K	V	G
	<i>А/Н.Новгород/1/09*</i>	H	S	A	S	S	D	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	T	R	S	K	V	G
	<i>А/С.-Петербург/151/13</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	K	S	T	T	R	S	K	V	D
	<i>А/С.-Петербург/204/09</i>	H	S	A	S	S	D	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	T	R	S	K	V	G
	<i>А/Воронеж/1/09*</i>	H	S	A	S	S	D	N	D	S	N	E	K	K	K	S	S	T	R	S	K	V	G
<i>А/Воронеж/1/11</i>	H	S	A	S	S	N	N	D	S	N	A	K	K	K	S	S	T	K	S	K	V	D	

вирусами «классического гриппа» свиней и родственными им вирусами гриппа человека

Таблица 3.19 (продолжение). Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, в сравнении с эталонными вирусами «классического гриппа» свиней и родственными им вирусами гриппа человека.

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции																					
		224	227	234	239	250	258	260	267	269	283	297	302	314	315	321	344	345	356	365	374	461	499
	Антигенные сайты/рецептор- связывающий сайт	С _а 2						С _б															
1930-2013	<i>А/свинья/Айова/15/30</i>	А	М	Л	Т	А	Н	Г	Т	Д	Н	Р	Е	М	В	И	Л	И	Г	Q	Г	С	Е
	<i>А/свинья/США/1976/31</i>	А	М	Л	Т	А	Н	Г	Т	Н	Н	Р	Е	М	В	И	Л	И	Г	Q	Г	С	Е
	<i>А/Нью Джерси/8/76</i>	А	М	Л	Т	В	Н	Г	И	Д	К	Р	Е	М	А	И	М	И	Е	Q	Г	С	Е
	<i>А/СССР/90/77</i>	А	И	Л	Т	А	Н	Г	Т	Н	Q	Р	Е	М	В	И	М	И	Е	Q	Г	С	К
	<i>А/Калифорния/07/09</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	И	М	В	Е	Л	Е	С	Е
	<i>А/С.-Петербург/5/09</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	Е	С	Е
	<i>А/С.-Петербург/27/11</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	Н	Е
	<i>А/С.-Петербург/100/11</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	Н	Е
	<i>А/Астрахань/1/11</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	С	Е
	<i>А/Белгород/2/10*</i>	Е	И	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	С	Н	Л	А	В	М	В	Е	Л	Е	С	Е
	<i>А/Екатеринбург/11/13</i>	Е	М	И	К	В	Е	Н	И	Д	Е	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	Н	К
	<i>А/Калининград/1/09</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	С	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	Е	С	Е
	<i>А/Киров/1/13</i>	Е	М	И	К	В	Е	Н	И	Д	Е	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	Н	К
	<i>А/Москва/18/13</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	Е	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	Н	К
	<i>А/Мурманск/1/11</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	Н	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	Н	Е
	<i>А/Н.Новгород/1/09*</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	И	М	В	Е	Л	Е	С	Е
	<i>А/С.-Петербург/151/13</i>	Е	М	И	К	В	Е	Н	И	Д	Е	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	Н	К
	<i>А/С.-Петербург/204/09</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	И	М	В	Е	Л	Е	С	Е
	<i>А/Воронеж/1/09*</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	И	М	В	Е	Л	Е	С	Е
<i>А/Воронеж/1/11</i>	Е	М	В	К	В	Е	Н	И	Д	К	Р	К	Л	А	В	М	В	Е	Л	К	С	Е	

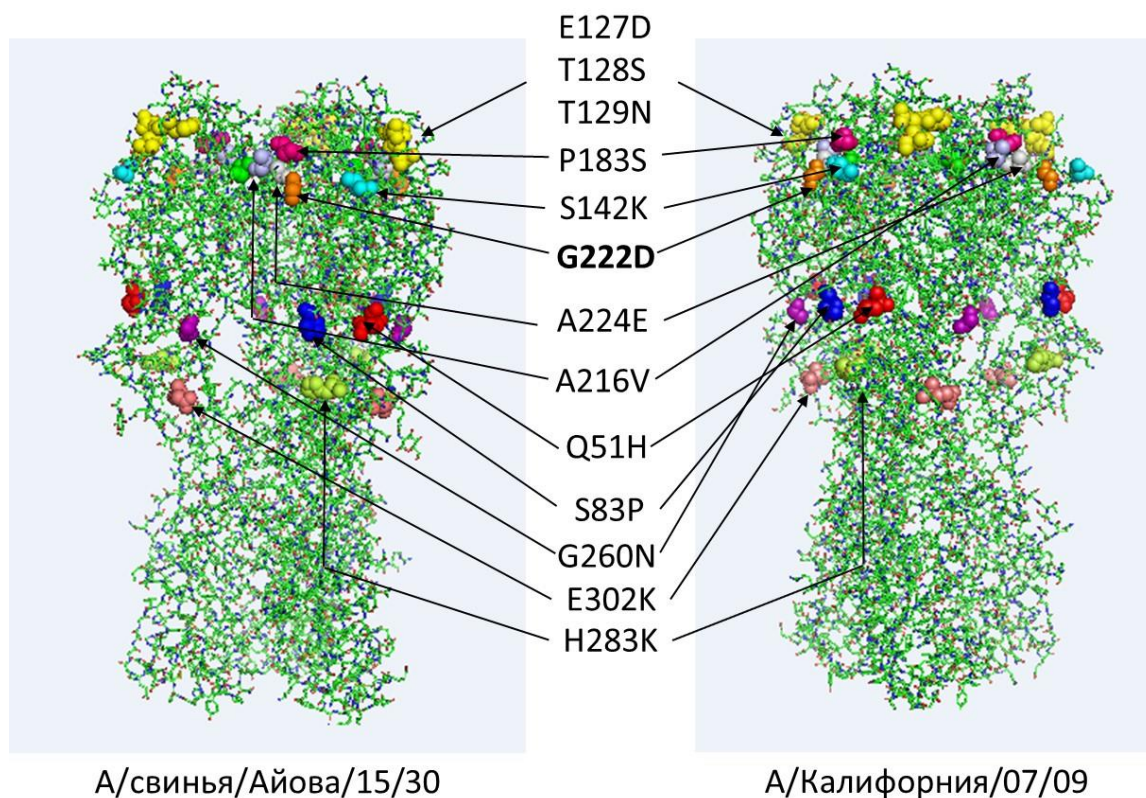


Рисунок 3.12. Основные аминокислотные отличия вирусов «классического» гриппа свиней и родственных им по НА вирусов гриппа человека от современных вирусов A(H1N1)pdm09.

3.4.2. Роль мутации D222G в НА вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и ее взаимосвязь с тяжелыми случаями течения гриппа

Уже на самых ранних этапах циркуляции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 было отмечено, что помимо двух рано возникших мутаций S203T и P83S, в НА пандемических штаммов наблюдается вариабельность в районе участка 222-223, расположенного в непосредственной близости к рецептор-связывающему сайту. Были высказаны предположения, что замена D222G приводит к изменению рецепторной специфичности вирусов гриппа подтипа A(H1N1)pdm09, давая им возможность более широкого спектра связывания α -2,3-сиаловых рецепторов, не теряя при этом сродства и к α -2,6-сиаловым рецепторам (Tse H. et al., 2011). При этом одновременно было установлено, что изоляты, выделенные от больных при

тяжелых и летальных случаях гриппа, содержат мутацию D222G чаще, чем она встречается среди клинических образцов, взятых от больных легкой или средней-тяжелой формой гриппа. Нами также были выделены вирусы гриппа из секционных материалов, которые несли данную замену (см. таблицы 3.15, 3.16, 3.18), однако эта же замена встречалась и у изолятов, выделенных из мазков от больных (А/Санкт-Петербург/35/09, А/Санкт-Петербург/204/09). Как и в других странах по миру, были также выявлены вирусы, несущие и другие замены в этом положении: D222N, D222E и даже очень необычный вариант D222A у вируса А/Астрахань/35/2011. Стоит подчеркнуть, что за исключением изолята А/Астрахань/35/2011, ни один другой штамм, несущий замену в 222 положении не обладал значимыми антигенными отличиями в РТГА.

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. Были найдены 166 последовательностей HA, из которых 109 – мазки из носа от больных, 57 – образцы аутопсийного материала. При анализе распространенности мутации в 222 положении были получены данные, представленные в виде диаграмм на рисунке 3.13. Установлено, что в секционном материале (во всех случаях, кроме 3 – фрагменты легкого) 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.

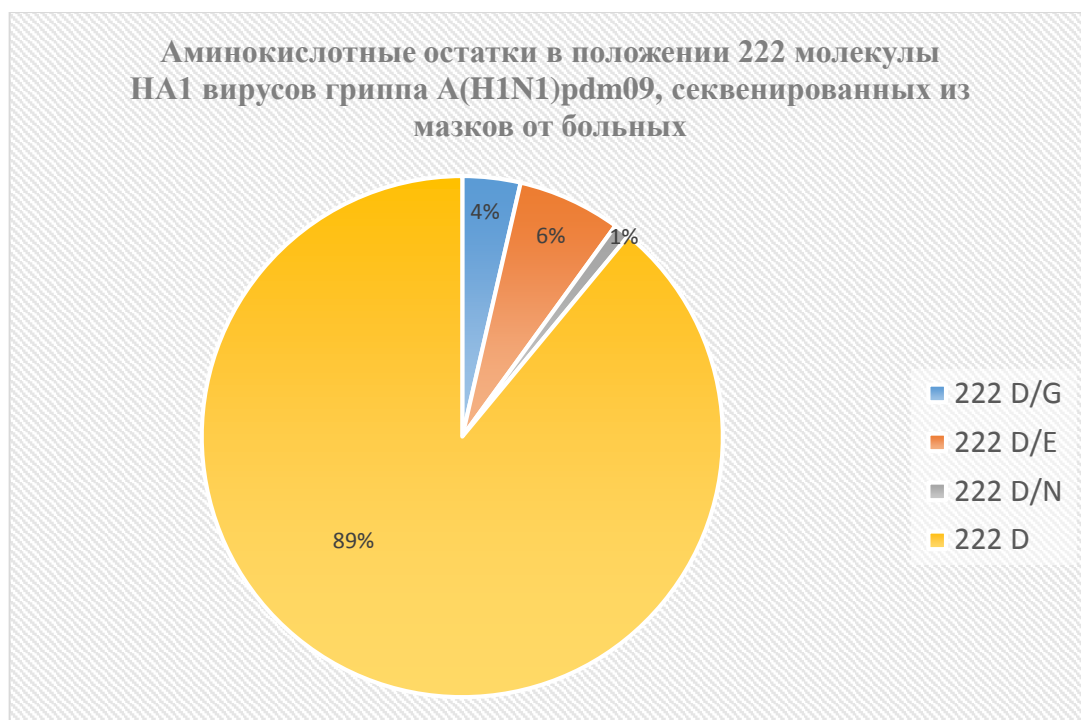


Рисунок 3.13. Сводные данные о частоте встречаемости замены в 222 положении молекулы HA1 у вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, секвенированных из мазков и аутопсийного материала, собранных в России в период с 2009 по 2013 гг. (по данным базы GenBank).

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 (см. таблицы 3.15, 3.16, 3.18), и не встречавшаяся ранее у сезонных вирусов A(H1N1). Роль этой мутации до конца не установлена, однако наиболее вероятно ее возникновение связано с системой выделения вируса. Сотрудничающий центр ВОЗ по гриппу в Лондоне считает, что Q223R напрямую связана с адаптацией вирусов A(H1N1)pdm09 при выделении/размножении на куриных эмбрионах. Интересно, что клетки куриного эмбриона несут на своей поверхности как α -2,3, так и α -2,6-сиаловые рецепторы. Возможно, что данная мутация, расположенная в непосредственной близости от рецептор-связывающего кармана обеспечивает необходимый баланс для оптимального роста вирусов в 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. Следовательно, помимо известных сайтов, изменяющихся в структуре вирусов A(H1N1) при адаптации к куриным эмбрионам (Shen J. et al., 2009), можно отнести и еще один, ярко проявляющийся при адаптации вирусов гриппа подтипа A(H1N1)pdm09.

3.4.3. Оценка сайтов позитивной селекции в молекуле HA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09. Филогенетические группы.

Циркуляция вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 в России началась поздней весной 2009 г и продолжается по настоящее время. За прошедший период можно оценить, насколько разнообразные факторы отбора действуют на вирусную популяцию, устойчиво сохраняющуюся среди людей на протяжении нескольких лет. Для этого нами было предпринято изучение сайтов в молекуле HA, находящихся под действием позитивной селекции, т.е. активно изменяющихся под действием

различных факторов, и прежде всего, под давлением отбора, связанного с популяционным иммунитетом. Одним из способов оценки различных видов селекции (позитивной, негативной, нейтральной) является установление отношения числа несинонимичных замен dS к числу синонимичных замен dN при анализе нуклеотидных последовательностей, кодирующих функционально значимые белки. Считается, что при отношении $dN/dS > 1$ (или $dN-dS > 0$), сайт находится под действием позитивной селекции. Существует несколько подходов для анализа селекции и действия отбора, которые описаны в работах (Kosakovsky Pong S.L., Frost S.D.W., 2005; Pong S.L. et al., 2010). Нами были выбраны наиболее часто используемые типы анализов SLAC, FEL и IFEL. SLAC (single likelihood ancestor counting) признан наиболее консервативным из этих методов, при котором параметры нуклеотидной и кодонной модели используются для определения предковой последовательности в узлах реконструированного филогенетического дерева. При уровне значимости $p=0,1$ SLAC может не обнаруживать сайтов позитивной селекции, которые будут найдены другими методами. Однако достоверность обнаруживаемых сайтов, подвергающихся позитивной селекции и выявленная этим методом наиболее высока по сравнению с другими подходами. FEL использует другой статистический подход для анализа числа dS и dN , а его разновидность IFEL оценивает давление отбора на уровне популяции. Подробное описание этих методов приведено в работе (Delport W. et al., 2010).

Для анализа были отобраны 77 последовательностей НА, полученных в период с 2009 по 2013 гг, а также эталонный штамм А/Калифорния/07/09, штамм А/Нью Джерси/8/76 и вирус гриппа свиней А/свинья/Айова/15/30. В таблице 3.20 приведены сравнительные данные, полученные тремя методами при уровне значимости $p=0,1$.

Таблица 3.20. Сайты в НА, находящиеся под действием позитивной селекции.

Метод анализа	Позиция АК, находящейся под действием позитивной селекции (при $p=0,1$)	Нормализованное значение dN-dS	Уровень значимости p
SLAC	222	4,2155	0,027
	223	5,4373	0,027
FEL	183	8,7335	0,0657
	191	12,9986	0,0212
	222	35,6042	0,0046
	223	76,0366	0,0054
	374 (HA2)	5,4397	0,0958
IFEL	222	20,7532	0,0315
	223	174,214	0,0058
	374 (HA2)	8,1437	0,0516

Все три метода 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. Важно отметить, что отбор действует и на положение 374, расположенное в HA2, и обеспечивающее дополнительную стабильность тримеру НА вирусов гриппа A(H1N1)pdm09. Остальные две позиции – 183 и 191 – были выявлены только методом FEL (при данном уровне значимости).

Стоит отметить, что вирусы, несущие реверсивную по отношению к А/Калифорния/07/09 замену Р183S стали появляться в России лишь в 2013 г., однако возможно их пропорция будет увеличиваться. Эта мутация характерна для вирусов, принадлежащих к 3-ей генетической группе, и была зафиксирована в 2013 г. только у двух российских изолятов (см. табл. 3.18). Замены в положении 191 с лейцина на изолейцин зафиксированы у отдельных штаммов 2009-2011 гг. выделения, однако вряд ли этот сайт можно считать достоверно находящимся под действием отбора, т.к. 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)рdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг.

В завершении, на рисунке 3.14 приводится филогенетическое дерево по гену НА, построенное методом максимального правдоподобия, на котором отмечены кандидаты в вакцинные штаммы (зеленые \diamond), референс-штаммы для генетических групп (красные \bullet) и вирусы, несущие замену в 222 положении (зеленые \blacktriangledown). На обоих рисунках отмечены основные генетические группы. Как уже отмечалось выше, такими группами, циркулировавшими в России с 2009 по 2013 гг. были группы 1, 6с, 7, а также небольшое количество вирусов относилось к генетическим группам 3, 4 и 5.

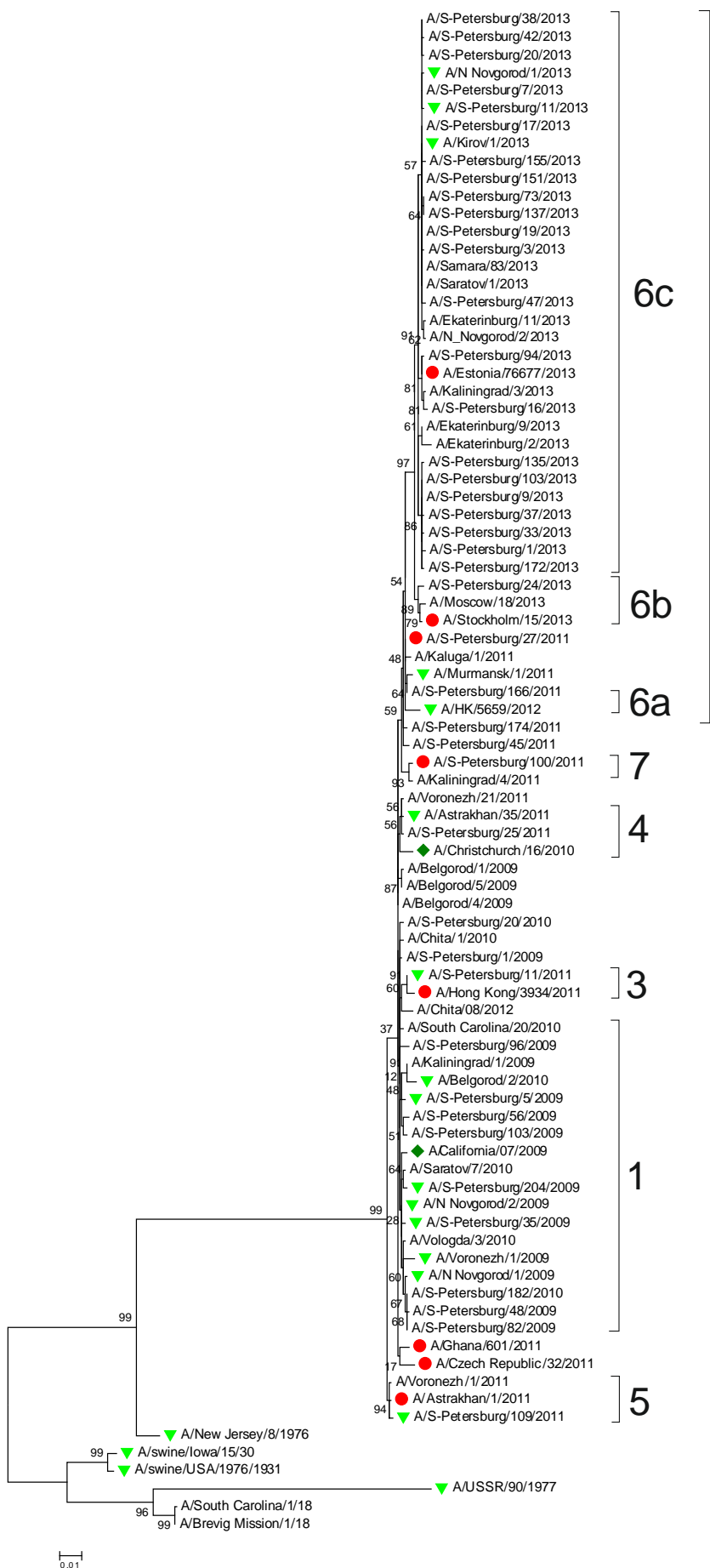


Рисунок 3.14.
 Филогенетическое
 дерево по гену НА,
 построенное методом
 максимального
 правдоподобия.

3.4.4. Анализ аминокислотного состава NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 гг.

Генетическая гетерогенность для второго поверхностного белка вируса гриппа – нейраминидазы – также была зарегистрирована на самых ранних стадиях циркуляции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 в популяции. Уже в сентябре 2009 г. было установлено, что большинство вирусов данного подтипа несут в NA две аминокислотные замены V106I и N248D, которые во всех случаях сочетались с заменой S203T в HA (см. табл. 3.21). 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. Как обсуждалось ранее, активность NA для большинства протестированных нами штаммов пандемического гриппа была сопоставима с вирусами сезонного гриппа A(H1N1) и вирусами гриппа свиней A(H1N1) и A(H1N1)pdm09 в связи с чем роль данных замен пока не установлена. Необходимо отметить, что помимо этих двух замен все российские изоляты 2009-2010 гг. приобрели также замену в 351 (V351F) положении, которая сохраняется и у современных штаммов. Данный аминокислотный остаток расположен в непосредственной близости от активного сайта фермента, а смена алифатической аминокислоты валина с коротким боковым радикалом на ароматический фенилаланин не может не отразиться на активности фермента. Так, в наших опытах было установлено, что активность вируса А/Калифорния/07/09 составляет 18,08 мкмоль 4-MU/мл*мин, в то время как для штамма А/Санкт-Петербург/5/09, несущего эту замену она в два раза выше и составляет 35,34 мкмоль 4-MU/мл*мин. 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 «старых» вирусов гриппа свиней и вируса А/Нью Джерси/8/76 (см. табл.3.24). Единственный эталонный штамм, несущий в этой позиции валин – это вирус

Таблица 3.21. Аминокислотные замены в молекуле NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг.

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции									
		106	199	248	257	263	351	363	373	386	436
	Антигенные сайты/рецептор- связывающий сайт		197- 199								
2009-2010	A/Калифорния/04/09	V	D	N	R	I	F	K	M	N	I
	A/Калифорния/07/09	V	D	N	R	I	V	K	M	N	I
	A/Львов/N6/09	I	D	D	R	I	F	K	M	N	I
	A/С.- Петербург/5/09	I		D			F				
	A/С.- Петербург/59/09	I		D			F				
	A/С.- Петербург/204/09	I		D		V	F				
	A/С.- Петербург/20/10	I		D			F			K	
	A/Белгород/1/09*	I		D			F		I		
	A/Белгород/5/09	I		D			F				
	A/Воронеж/1/09*	I		D			F				
	A/Чита/1/09	I		D			F				
	A/Калининград/1/09	I		D			F				
	A/Саратов/7/09*	I		D		V	F	R			
	A/Вологда/3/10	I	G	D	K		F				
A/Белгород/2/10*	I		D			F				T	

A/СССР/90/1977, однако он обладает рядом других существенных АК замен в NA, которые обеспечивают функциональную активность фермента. Среди других аминокислотных замен, выявленных у штаммов 2009-2010 гг выделения, присутствуют одиночные штаммоспецифические замены D199G, R157K, V263I, K363R, N386K, не получившие распространения в вирусной популяции в дальнейшие годы. Лишь замена V263I спорадически отмечается для вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и в настоящее время. Стоит отметить, что замена N386K у штамма A/Санкт-Петербург/20/10 привела к утрате потенциального сайта гликозилирования, однако в дальнейшем она не была отмечена ни у одного изолята.

В следующем эпидемическом сезоне 2010-2011 г. вариабельность аминокислотного состава NA вирусов пандемического гриппа 2009г. возросла. Постепенно начали появляться отдельные кластеры, характеризующиеся определенными аминокислотными заменами. Так, зимой 2011 г отчетливо выделился кластер вирусов, циркулировавших в Европе, несущий замены V264I, N397K, S442I. Вирусы, несущие подобные аминокислотные замены были выделены и в России (см. табл. 3.22): это изоляты А/Санкт-Петербург/25/11 и А/Воронеж/21/11, у которых помимо перечисленных замен обнаружена также мутация I359V, не встречавшаяся у других штаммов.

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). Обе эти группы несли дополнительные замены R220K, I389K или I46T, I467V. 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. Отметим, что 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)рdm09 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. Отметим, однако, следующие интересные особенности. Во-первых, почти у всех изолятов этого сезона произошла реверсия в позициях I106V и D248N, таким образом в этих позициях

Таблица 3.22. Аминокислотные замены в молекуле NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2010-2011 гг.

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции																	
		11	44	53	106	220	241	248	264	313	351	357	359	369	389	394	397	438	442
	Антигенные сайты/рецептор- связывающий сайт					220 - 221							367 - 370						
2010-2011	<i>A/Калифорния/07/09</i>	G	N	V	V	R	V	N	V	Q	Y	V	I	N	I	V	N	T	S
	<i>A/Крайстчерч/16/10</i>	G	N	V	I	R	V	D	V	Q	F	V	I	N	I	V	N	T	S
	<i>A/С-Петербург/182/10</i>			I	I			D			F								
	<i>A/С-Петербург/25/11</i>				I			D	I		F		V				K		I
	<i>A/С-Петербург/27/11</i>				I		I	D			F			K					
	<i>A/С-Петербург/45/11</i>				I		I	D			F			K					
	<i>A/С-Петербург/100/11*</i>		S		I		I	D			F	I		K					
	<i>A/С-Петербург/11/11</i>				I	K		D		R	F			K	K	I			
	<i>A/С-Петербург/174/11</i>				I		I	D			F			K					
	<i>A/Воронеж/1/11*</i>				I		I	D			F			K					
	<i>A/Воронеж/21/11</i>				I			D	I		F		V				K		I
	<i>A/Калуга/1/11*</i>				I		I	D			F			K				A	
	<i>A/Мурманск/1/11</i>	S			I			D			F			K					
	<i>A/Калининград/4/11</i>		S		I		I	D			F			K					
<i>A/Астрахань/1/11</i>				I		I	D			F			K						

вновь преобладали аминокислоты, характерные для ранних эталонов A(H1N1)pdm09 А/Калифорния/04/09 и А/Калифорния/07/09 (см табл.3.23). Все проанализированные изоляты содержат замены N241I и N369K, однако они также приобрели дополнительные замены N44S и N200S, которая встречается у всех штаммов, за исключением А/Санкт-Петербург/24/13, который также сохранил V106I, но имеет реверсивную замену D248N. В отличие от него, вирус А/Екатеринбург/9/13 наоборот, сохранил N248D, но несет реверсию I106V, а также необычную замену в 313 положении (нехарактерную для своей генетической группы по NA) с глутамина на гистидин. Еще одним 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. Напомним, что 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 гемаггютина. Для более глубокого анализа нами был проведен анализ последовательностей NA современных штаммов A(H1N1)pdm09 с NA вирусов гриппа свиней и родственных им штаммов. Так, из таблицы 3.24 следует, что замена S44N, обнаруживаемая у вирусов 2013 г выделения, является по сути также реверсивной, т.к. аспарагин в этой позиции уже встречался в вируса А/Нью Джерси/8/76. Мутации N248D и N369K, получившие широкое распространение в мире, ранее встречались у штамма А/СССР/90/1977 г. Сравнение основных аминокислотных отличий по NA между вирусами «классического» гриппа свиней и эталоном А/Калифорния/07/09 приведено на рисунке 3.15.

Таблица 3.23. Аминокислотные замены в молекуле NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2012-2013 гг.

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09	№ аминокислотной позиции																		
		34	41	44	82	106	155	200	241	248	263	270	274	313	321	339	351	369	432	451
	Антигенные сайты/рецептор-связывающий сайт															339 -			431- 434	
2012-2013	A/Калифорния/07/09	I	I	N	S	V	Y	N	V	N	I	N	H	Q	I	S	Y	N	K	D
	A/Астрахань/1/11	I	I	N	S	I	Y	N	I	D	I	N	H	Q	I	S	F	K	K	D
	A/С.-Петербург/27/11	I	I	N	S	I	Y	N	I	N	I	N	H	Q	I	S	F	K	K	D
	A/С.-Петербург/100/11	I	I	N	S	I	Y	N	I	N	I	N	H	Q	I	S	F	K	K	D
	A/С-Петербург/11/13			S			F	S	I								F	K		
	A/С-Петербург/33/13			S				S	I								F	K		
	A/С-Петербург/37/13			S				S	I								F	K		
	A/С-Петербург/24/13					I			I								F	K		
	A/С-Петербург/135/13			S				S	I		V	K					F	K		
	A/С-Петербург/151/13			S			F	S	I				Y				F	K		
	A/Екатеринбург/9/13			S	P			S	I	D				H			F	K		
	A/Екатеринбург/11/13			S				S	I								F	K		
	A/Калининград/3/13*			S				S	I								F	K		
	A/Киров/1/13*			S				S	I								F	K		
	A/Н.Новгород/1/13*			S				S	I								F	K		
	A/Н.Новгород/2/13*			S				S	I								F	K		
A/Москва/18/13	V	V	S				S	I						V	P	F	K	E	G	

Таблица 3.24. Аминокислотные замены в НА вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09, в сравнении с эталонными

Эпидеми- ческий сезон	Эталонные, референс- и репрезентативные штаммы вируса гриппа А(Н1N1)рdm09	№ аминокислотной позиции														
		41	42	44	80	106	200	241	248	263	321	339	351	369	432	452
	Антигенные сайты/рецептор- связывающий сайт											339 -		367 -	431 -	
1930-2013	А/свинья/Айова/15/30	R	D	N	A	I	N	I	N	I	V	S	F	S	K	D
	А/свинья/США/1976/31	R	D	N	A	I	N	I	N	I	V	S	F	N	K	D
	А/Нью Джерси/8/76	G	E	S	V	I	N	I	N	I	V	L	F	S	K	G
	А/СССР/90/1977	G	S	N	T	I	D	I	D	I	V	N	Y	K	R	D
	А/Калифорния/07/09	G	N	N	V	V	N	V	N	I	I	S	Y	N	K	D
	А/С.-Петербург/05/09	G	N	N	V	I	N	V	D	I	I	S	F	N	K	D
	А/Калининград/1/09	G	N	N	V	I	N	V	D	I	I	S	F	N	K	D
	А/Н.Новгород/1/1/09*	G	N	N	V	I	N	V	D	I	I	S	F	N	K	D
	А/Воронеж/1/09*	G	N	N	V	I	N	V	D	I	I	S	F	N	K	D
	А/С.-Петербург/204/09	G	N	N	V	I	N	V	D	V	I	S	F	N	K	D
	А/Белгород/2/10*	G	N	N	V	I	N	V	D	I	I	S	F	N	K	D
	А/Астрахань/1/11	G	N	N	V	I	N	I	D	I	I	S	F	K	K	D
	А/С.-Петербург/100/11*	G	N	S	V	I	N	I	D	I	I	S	F	K	K	D
	А/С.-Петербург/27/11	G	N	N	V	I	N	I	D	I	I	S	F	K	K	D
	А/Воронеж/1/11*	G	N	N	V	I	N	I	D	I	I	S	F	K	K	D
	А/Екатеринбург/11/13	G	N	S	V	V	S	I	N	I	I	S	F	K	K	D
	А/Киров/1/13	G	N	S	V	V	S	I	N	I	I	S	F	K	K	D
	А/Москва/18/13	V	N	S	V	V	S	I	N	I	V	P	F	K	E	G
А/С.-Петербург/151/13	G	N	S	V	V	S	I	N	I	I	S	F	K	K	D	

вирусами

«классического

гриппа» свиней и

родственными им

вирусами гриппа

человека

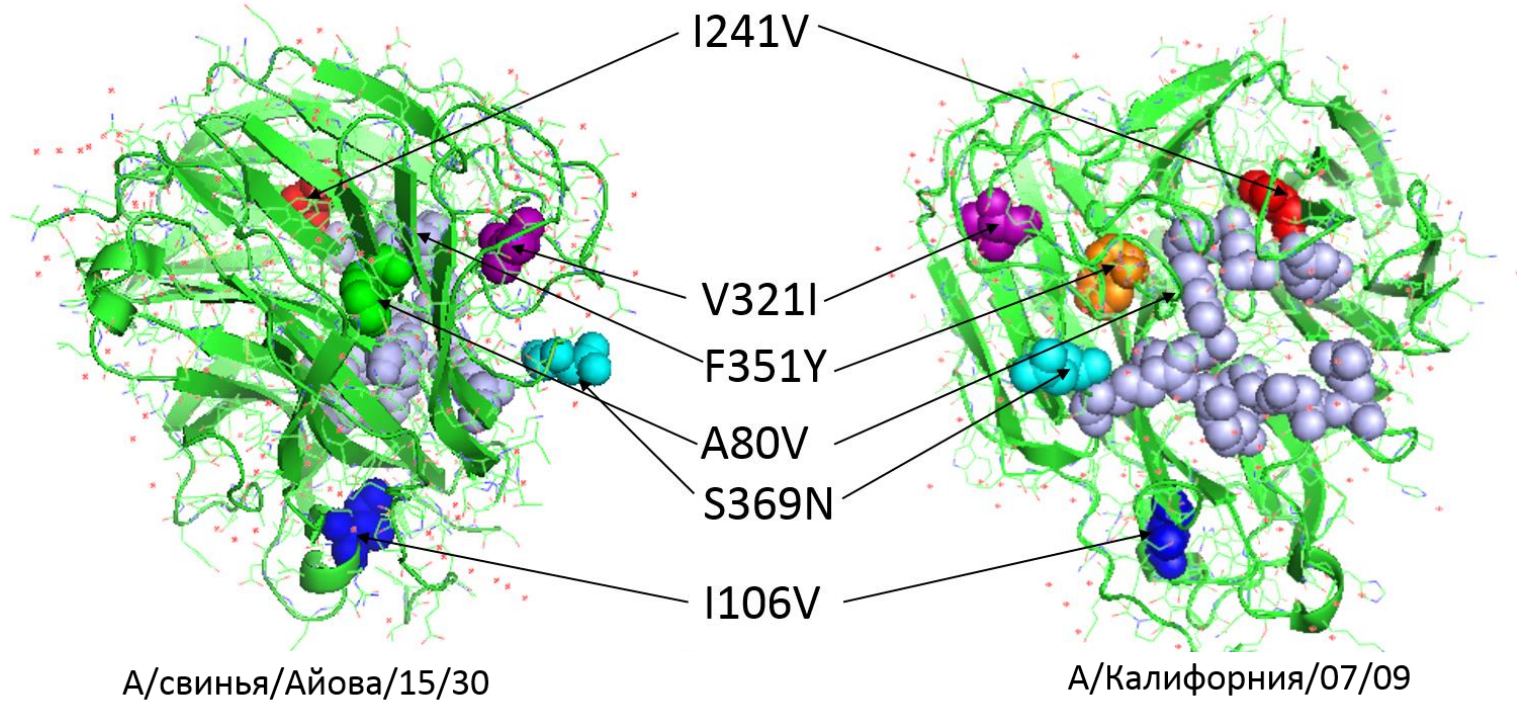


Рисунок 3.15. Основные аминокислотные отличия вирусов «классического» гриппа свиней и родственников им по NA вирусов гриппа человека от современных вирусов A(H1N1)pdm09 (представлен мономер NA).

3.4.5. Оценка сайтов позитивной селекции в молекуле NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09. Филогенетические группы.

Для оценки сайтов, находящихся под действием отбора в NA, были использованы те же методы, что и для HA. Однако 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 (см. табл. 3.25). Так, при оценке позитивной селекции при уровне значимости $p=0,1$, ни один из методов не выявил ни одного сайта. Однако, по мнению разработчиков программного обеспечения для обнаружения позитивной селекции, это вовсе не означает, что таких сайтов нет. В этом случае они рекомендуют увеличить значение p до $p=0,2$, что несомненно снижает достоверность получаемых результатов, однако авторы убеждены, что сайты, обнаруживаемые при данном уровне значимости могут с большой долей вероятности в действительности находится под действием позитивной селекции. В этом случае, действительно, два из трех подходов выявляют такие сайты в NA. В случае FEL-анализа был выявлен аминокислотный остаток 313, изменения в котором характерны для изолятов 3-ей генетической группы (по HA). В случае разновидности FEL анализа, применяемого для анализа позитивной селекции на популяционном уровне 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. Функциональное значение селекции именно в этих областях не всегда может охарактеризовано. Так, 155 и 200 положения 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. Вероятно, что более длительная циркуляция вирусов гриппа A подтипа A(H1N1)pdm09 постепенно приведет к с большей точностью.

Таблица 3.25. Сайты в NA, находящиеся под действием позитивной селекции.

Метод	Уровень значимости p	АК, находящиеся под действием селекции	Нормализованное значение dN-dS	Значение p
SLAC	0,1	Нет		
	0,2	Нет		
FEL	0,1	Нет		
	0,2	313	101,282	0,1422
IFEL	0,1	Нет		
	0,2	44	115,398	0,1939
		155	163,986	0,1463
		200	115,717	0,1934
		264	114,464	0,1426
		369	120,083	0,1999
		397	118,559	0,1979
442	122,437	0,1503		

На рисунке 3.16 приводится филогенетическое дерево по гену NA, построенное методом максимального правдоподобия, на котором отмечены кандидаты в вакцинные штаммы (зеленые \blacklozenge), референс-штаммы для генетических групп (красные \bullet) и вирусы, несущие замену в 274 положении (синий \blacksquare). На рисунке отмечены основные генетические группы,

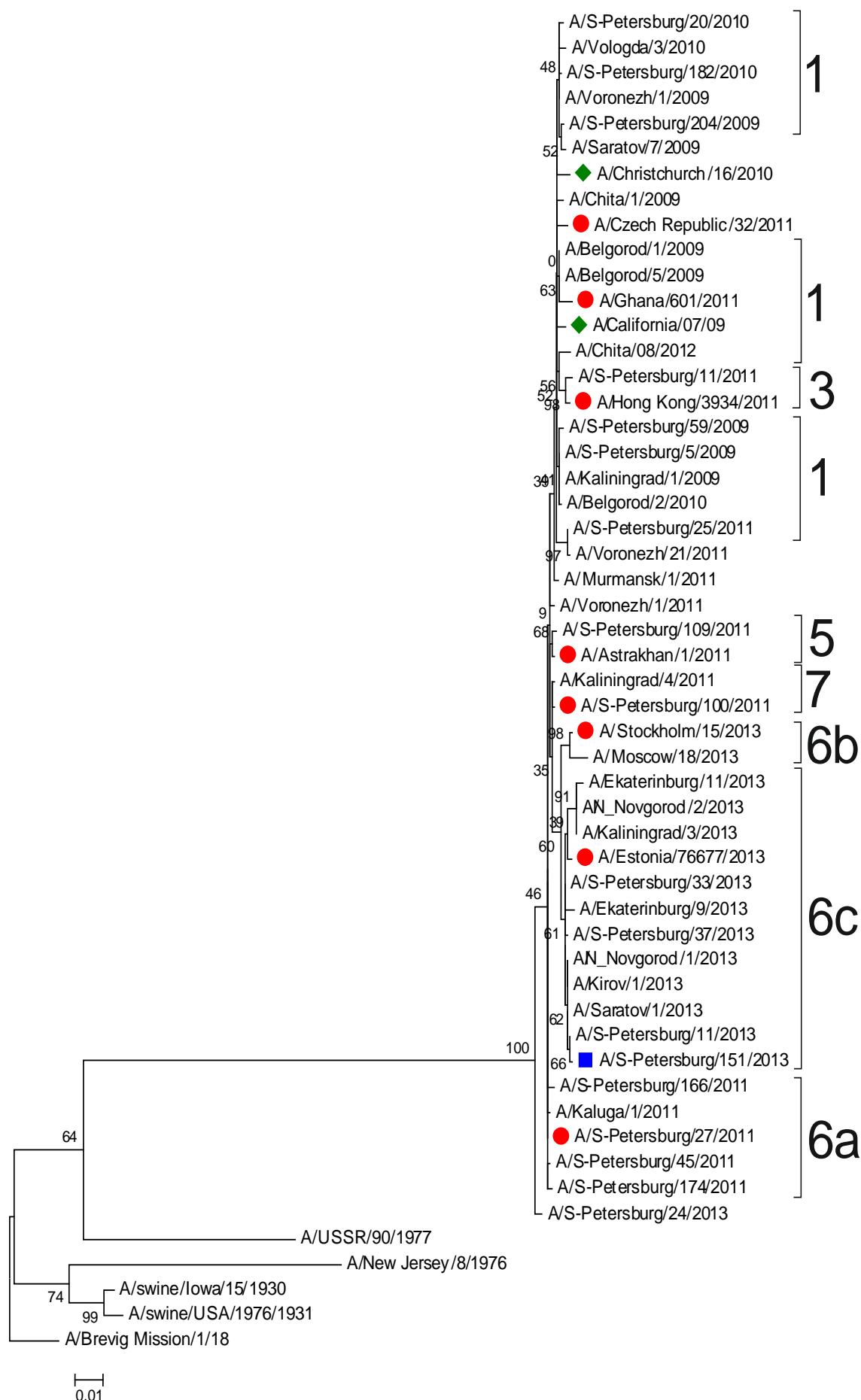


Рисунок 3.16. Филогенетическое дерево по гену NA, построенное методом максимального правдоподобия (приведены группы соответствия по NA).

соответствующие группам по HA, так отдельных генетических групп для NA предложено не было.

Заметим, что особый интерес представляет изолят A/Санкт-Петербург/24/2013, который по гену HA четко относится к группе 6b, однако по NA явно выпадает из этой группы. Это может свидетельствовать о том, что данный вирус является межгрупповым реассортантом, т.е. несет HA одной генетической группы, а NA другой генетической группы. Такие случаи описаны в литературе, хотя для вирусов пандемического гриппа пока являются достаточно редкими.

3.4.6. Заключение.

Проведенный генетический анализ показал, что антигенное однообразие вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в 2009-2013 гг., сопровождается выраженной генетической неоднородностью. Особенно ярко это выражено в отношении HA, и в меньшей степени, для NA. Обнаружение сайтов позитивной селекции свидетельствует о постоянном давлении отбора на вирусную популяцию, что приводит к постоянным изменениям в поверхностных белках вируса, и способствует отбору штаммов, обладающих селективными преимуществами. В целом, в России за указанный период наблюдалась циркуляция всех наиболее распространенных в мире генетических групп и подгрупп вирусов A(H1N1)pdm09.

ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Особенности выделения вирусов пандемического гриппа с использованием культур клеток и куриных эмбрионов.

Выделение вирусов пандемического гриппа в ходе данного исследования осуществлялось по тем же принципам, что и выделение вирусов гриппа в эпидемические сезоны предыдущих лет. Параллельное использование двух модельных систем – КЭ и клеточной культуры MDCK, рекомендованное ВОЗ (WHO manual on influenza diagnosis, 2011), позволяло достаточно эффективно изолировать вирусы из носовых смывов и секционных материалов. Однако для вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 наблюдалась тенденция к более предпочтительному размножению на куриных эмбрионах, чем на клеточной культуре MDCK. Косвенно, это положение подтверждалось несколькими фактами. Вирусы, выделенные на эмбрионах, легче поддавались пассированию с целью увеличения титра ГА. Выделение вирусов из секционного материала происходило на КЭ намного эффективнее, чем в использованных культурах клеток. Учитывая «свиное» происхождение данных вирусов, эти факты находят подтверждение и в литературных данных: показано, что вирусы, выделяемые от свиней, как из назофарингиальных мазков, так и из секционного материала, также эффективнее реплицируются на куриных эмбрионах, чем на MDCK (Clavijo A. et al., 2002). Вирусы A(H1N1)pdm09, выделенные и пассируемые на клеточной культуре MDCK, даже с достоверно высокими титрами ГА, быстро утрачивали ГА активность при условии хранения при +4°C, что не было отмечено ранее для эпидемических изолятов вирусов гриппа А и В.

Использование альтернативных клеточных линий человека и животных не позволило добиться существенного улучшения при выделении вирусов как из мазков от больных, так и при работе с секционным материалом. Клетки CaCo-2 были получены в 1983 г. (Pinto M. et al., 1983) из аденокарциномы ободочной кишки человека, однако впервые их применение для изоляции вирусов гриппа человека было предложено японскими исследователями в 1998 г. (Yoshino S. et al.,

1998). В последние годы появилось несколько сообщений об использовании клеток CaCo-2 для работы с вирусами гриппа А различного происхождения. Об успешном применении клеток CaCo-2 при выделении вирусов гриппа от свиней сообщили Чиापони с соавторами (Chiapponi C. et al., 2010). Об использовании клеток CaCo-2 для работы с низкопатогенными штаммами вируса птичьего гриппа было сообщено Джахангир с коллегами (Jahangir D. et al., 2010): 17 низкопатогенных вирусов репродуцировались в высоких титрах и образовывали бляшки в клетках CaCo-2 более эффективно, чем в клетках MDCK, при этом не было отмечено фенотипических и генотипических изменений на протяжении 10 пассажей. Однако эти клетки оказались менее чувствительными при выделении птичьих вирусов, по сравнению с куриными эмбрионами. Высокая чувствительность клеток CaCo-2, сравнимая с клетками MDCK, к вирусам гриппа А различного происхождения: А(Н1N1) эпидемического, А(Н1N1) пандемического и А(Н5N1) - отмечена в работе Ли с соавторами (Li I.W.S. et al., 2009). Результаты, полученные с использованием линии CaCo-2, в ходе выполнения текущего исследования позволили подтвердить чувствительность данной клеточной линии к вирусам гриппа человека. При этом, эффективность выделения вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 на линии CaCo-2 была сравнима с таковой для MDCK. При выделении вирусов гриппа на клетках MDCK в среду необходимо добавлять трипсин для протеолитического процессинга молекулы HA0 на HA1 и HA2. Для CaCo-2 добавление трипсина не требуется, поскольку Жирнов с коллегами (Zhirnov O., Klenk H.D., 2003) обнаружил уникальную особенность клеток CaCo-2 осуществлять внутриклеточный протеолиз гемагглютинаина вируса гриппа на HA1 и HA2 за счет наличия эндогенных протеаз. По этой же причине данная культура не требует отмывок от ростовой среды, что существенно ускоряет процесс выделения вируса. Дифференцированность и поляризация клеток CaCo-2 позволяет вирусу гриппа наиболее эффективно инфицировать клетки и осуществлять выход зрелых вирусных частиц через апикальную поверхность (Jackman M.R. et al., 1994). Вирусы гриппа, как и в клетках MDCK, вызывают в клетках CaCo-2 развитие ЦПД и выход вируса в культуральную жидкость. Еще одно свойство этой линии дает ей преимущество

перед MDCK при работе с секционными материалами. Жирнов с соавторами (Zhirnov O. et al., 2003) обнаружили, что вирусы гриппа не индуцируют в клетках CaCo-2 апоптоз, в отличие от большинства других линий, протестированных в эксперименте. В этих клетках, как и некоторых других (например, SJPL – клетках легкого свиньи) в ответ на вирусную инфекцию запускается некротический путь гибели (Seo H. et al., 2001). Гибель клеток путем апоптоза при вирусной инфекции – быстро протекающая реакция, которая достигает своего максимума через 24-48 ч после инфицирования в зависимости от множественности инфекции. В то же время некротические реакции протекают медленнее, что важно при выделении вирусов из секционного материала, где количество полноценных инфекционных частиц, как правило, невелико. Возможно, именно благодаря этой особенности на клетках CaCo-2 удалось изолировать большее количество вирусов из секционных материалов, чем на культуре MDCK.

Применение генномодифицированной линии MDCK-Siat1 не дало значимых отличий от родительской линии MDCK при выделении вирусов. MDCK-Siat1 – это вариант клеточной линии MDCK, стабильно экспрессирующий человеческую *СМР-N-ацетилнейраминат:β-галактозид α-2,6 сиалилтрансферазу* – фермент, который приводит к сверхэкспрессии на поверхности клеток рецепторов «человеческого» α-2,6 типа (Matrosovich M. et al., 2003). Тестирование данной линии для вирусывыделения проводилось группой австралийских ученых в сотрудничестве с региональным центром ВОЗ (Oh D.Y. et al., 2008). При сравнительном тестировании 125 вирусов на MDCK и MDCK-Siat1, последняя линия показала значительно лучший результат (на треть больше вирусов восстановилось). Наиболее оптимальной MDCK-Siat1 показала себя для выделения вирусов А(Н3N2). Титры в пробах на MDCK-Siat1 были выше для вирусов гриппа А, тогда как для вирусов гриппа В разницы обнаружено не было. В отличие от пассирования и выделения на куриных эмбрионах, ни на MDCK, ни на MDCK-Siat1 не происходило мутирования исходного вирусного материала как минимум на первых двух пассажах. В связи с обогащением данной клеточной линии

рецепторами «человеческого типа» вирусы подтипа А(Н3N2) при пассировании на MDCK-Siat1 теряли способность связывать куриные эритроциты, а для вирусов подтипа А(Н1N1) такой тенденции не отмечалось. Исследований с использованием линии MDCK-Siat1 для выделения вирусов пандемического гриппа 2009 г., а также для выделения вирусов из секционного материала, не опубликовано. Однако на основании данных текущей работы можно заключить, что применение MDCK-Siat1 не давало преимуществ при изоляции вирусов А(Н1N1)pdm09, как при выделении вирусов из материалов от больных, так и при работе с секционными материалами.

В завершении данного раздела еще раз отметим, что выделение вирусов пандемического гриппа из материалов от больных в целом было эффективно как на клеточных линиях, так и на куриных эмбрионах, в то время как для работы с секционным материалом куриные эмбрионы были предпочтительной системой изоляции. Из литературных данных известно, что адаптация вирусов гриппа к росту на КЭ приводит к быстрому появлению мутаций в области рецептор-связывающего сайта НА, а также влияет на утрату/приобретение сайтов гликозилирования (Говоркова Е.А., 2008). Поэтому вирусы, выделенные в данной системе, не могут рассматриваться в качестве «природных» неизмененных изолятов. Так, для вирусов А(Н1N1)pdm09 были выявлены замены в области РСС (в позициях 222 и 223), связанные с адаптацией вирусов к росту на КЭ, т.к. при секвенировании вирусной РНК из исходных образцов мутаций в этих позициях не обнаружено (Yasugi M. et al., 2012). При этом, вирусы, выделенные в системе КЭ, используются для создания вакцинных штаммов, поскольку основной объем вакцин против гриппа производится с использованием КЭ. В этой связи выделение вирусов гриппа на КЭ как из секционных материалов, так и из материалов от больных, по-прежнему является актуальной задачей, несмотря на отличия выделяемых штаммов от исходных вирусов в образце, возникающих при адаптации к КЭ.

4.2. Биологические свойства вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09.

4.2.1. Репликация вирусов гриппа А различного происхождения в монослойных клеточных линиях. В перmissive клеточных культурах имеются все условия для продуктивной вирусной инфекции. По отношению к вирусу гриппа А такими клетками являются клетки почки собаки MDCK. Известно, что на поверхности клеточной мембраны клеток MDCK представлены оба типа рецепторов (α -2,3 и α -2,6), что позволяет адсорбироваться как вирусам человеческого происхождения, так и птичьего, и свиного происхождения. Кроме этого, в клетках MDCK имеются все условия для полноценного синтеза вирусных РНК и белков и формирования зрелых вирусных частиц. Известна более низкая продуктивность вирусов гриппа в клетках карциномы легких человека А-549 по сравнению с клетками MDCK, что объясняется нарушением процессинга вирусных белков в аппарате Гольджи (Ueda M. et al., 2008). Совершенно очевидно, что клетки человеческого происхождения пригодны для репродукции вирусов гриппа птичьего происхождения и эпидемических вирусов человека, хотя выход инфекционного вируса намного ниже, чем в клетках MDCK и СП, однако они оказались практически неперmissive для пандемических вирусов свиного происхождения. Тем не менее, в клетках человека, зараженных вирусами свиного происхождения, происходит синтез вирусных белков (NP) и индуцируется апоптоз.

Эффективность репликации вирусов гриппа на клеточных линиях определяется многочисленными факторами. Важно различать способность вируса инфицировать культуру клеток (т.е. способность вируса проникать внутрь клетки и осуществлять экспрессию генетического материала) и возможность клеточной линии поддерживать продуктивную вирусную инфекцию (при которой проходит полный цикл жизненного цикла с формированием полноценных вирусных частиц, способных отпочковываться от клеточной мембраны и инфицировать соседние клетки). Вирусы гриппа способны инфицировать самый широкий спектр клеточных линий, что подтверждается многочисленными данными литературы (Дерябин и др., 2007; Li I.W.S. et al., 2009; Massin P. et al., 2010), однако продуктивную вирусную инфекцию обеспечивают лишь некоторые клеточные

линии. Так, клетки норок Mv1Lu могут быть инфицированы самыми различными вирусами гриппа, однако они не способны эффективно поддерживать продуктивную инфекцию вирусов гриппа (Schultz-Cherry S. et al., 1998; Zhai W. et al., 2012). Клетки аденокарциномы легкого A-549, наиболее часто используемая клеточная модель человеческого происхождения, также не способны образовывать полноценное вирусное потомство. В клетках A-549 титры вируса ниже, чем в клетках MDCK из-за пониженного синтеза вирусного гемагглютинина в результате замедления его транспорта из эндоплазматического ретикулума в транс-Гольджи сеть, где созревание и фолдинг HA происходят намного медленнее, чем в высокопермиссивных клетках MDCK (Ueda M. et al., 2008). В клетках Vero, широко используемых для изготовления противовирусных вакцин, требуется предварительная адаптация вирусов гриппа, сопровождающаяся мутациями в стеблевой части молекулы HA, для их последующей эффективной репликации (Roedig J.V. et al., 2011). Более того, поскольку в этих клетках (также как и клетках MDCK) нет эндогенной протеазы, необходимой для протеолитического расщепления молекулы HA на две субъединицы и образования полноценного инфекционного потомства, необходимо добавление экзогенного трипсина для формирования зрелых вирионов.

Наши исследования выявили, что вирусы гриппа птиц подтипа A(H5N1) инфицировали все тестируемые линии животных и человека за исключением линии Girardi Heart. Эти данные полностью согласуются с данными литературы (Дерябин и др., 2007; Li I.W.S. et al., 2009). Известно, что вирулентность высокопатогенных штаммов вируса гриппа A(H5N1) обусловлена наличием кластера положительно заряженных аминокислот в сайте расщепления белка HA. Такой кливэдж-сайт может расщепляться фуриновыми клеточными протеазами, которые присутствуют в большинстве клеток, в связи с чем вирусы A(H5N1) могут быстро распространяться и реплицироваться практически в любом органе, вызывая системную инфекцию. Как видно из рисунка 4.1, у низкопатогенных штаммов вируса гриппа птиц, выделенных в Казахстане, сайт расщепления гемагглютинина

вместо характерной для высокопатогенных вирусов инсерции RRRKK (АК 341-344) несет остаток треонина (Т341), и имеет строение QRET (АК 338-341), и, следовательно, не содержит кластер аминокислотных остатков, характерный для многих штаммов высокопатогенных вирусов гриппа. Все вирусы гриппа свиней и человека также не имеют полиосновной последовательности расщепления в кливэдж-сайте НА.

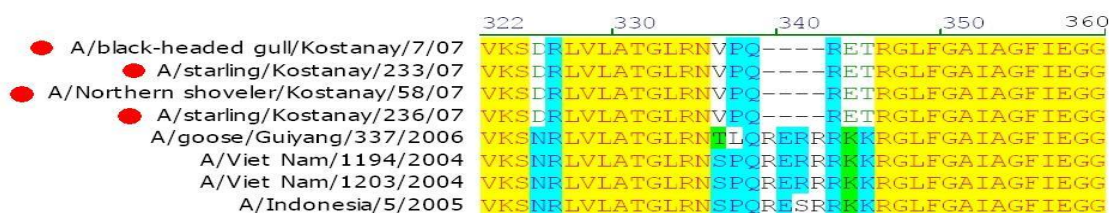


Рисунок 4.1. Предсказанные аминокислотные последовательности участка молекулы НА в районе сайта протеолитического расщепления для вирусов гриппа А(Н5N1).

Красным кружком (●) отмечены низкопатогенные штаммы, полученные из Казахстана. Остальные штаммы – вирусы высокопатогенного гриппа птиц.

В наших экспериментах эффективная репликация вирусов гриппа подтипа А(Н5N1) была отмечена как для высокопатогенного штамма А/Курица/Курган/5/05, так и для низкопатогенных штаммов. Все три штамма подтипа А(Н5N1) интенсивно реплицировались на клеточных линиях собаки (MDCK) и свиньи (СП), а также в клеточной культуре эндотелия и карциномы ободочной кишки человека (CaCo-2).

Наши данные указывают на высокую чувствительность эндотелиальной линии ECV-304 к вирусам гриппа А(Н5N1), как к инфицированию, так и к поддержанию репродукции вирусов птичьего гриппа. При этом, вирусы пандемического гриппа, также как и сезонного гриппа, и вирусы гриппа свиней, были способны к репликации в клетках эндотелия, однако их инфекционная активность была значительно ниже. Виман с соавторами (Viemann D. et al., 2011) удалось показать, что инфицирование эндотелиальных клеток (на модели HUVEC) высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1) приводит к дисбалансу защитных

механизмов на клеточном уровне: происходит гиперактивация NF-κB-зависимых генов и сверхпродукции провоспалительных цитокинов, в то время как инфекция низкопатогенными вирусами A(H1N1) и A(H7N1) не вызывает такого ответа в клетках эндотелия. Блок NF-κB приводит к неспособности вирусов гриппа A(H5N1) реплицироваться в клетках эндотелия. К сожалению, авторы не исследовали низкопатогенные вирусы гриппа A(H5N1), так что остается не ясным, какие механизмы противовирусной защиты используются клетками при инфекции данными вирусами.

Все протестированные в эксперименте вирусы были способны к эффективной репродукции на культурах клеток собаки (MDCK) и свиньи (СП). В то же время, вирусы гриппа человека A(H1N1), A(H2N2) и A(H3N2) показали пониженный уровень репродукции на культурах клеток человека, за исключением одной линии – карциномы ободочной кишки человека CaCo-2, на которой была отмечена эффективная репродукция всех протестированных штаммов. Тем удивительней результаты, полученные для вирусов пандемического гриппа 2009 г. и вирусов гриппа свиней, репродукция которых оказалась намного менее выраженной практически во всех клетках человеческого происхождения, за исключением линии CaCo-2, хотя синтез вирусных белков в них происходит, что подтверждается данными в ИФА. Возможно, это связано с измененным строением рецептор-связывающего кармана вирусов A(H1N1)pdm09 (см. литобзор), которому необходим более плотный контакт с сиаловой кислотой для обеспечения эффективного связывания вирусной частицы с рецептором. Как считают некоторые авторы, это может приводить к менее эффективному связыванию вирусов с рецепторами на поверхности клеток, чем и может объясняться такая пониженная инфекционная активность вирусов A(H1N1)pdm09 в культурах клеток человека *in vitro*. Возможно, что вирусы с измененными рецептор-связывающими свойствами, несущие мутацию D222G и/или Q223R, имеют более высокую инфекционную активность в культурах клеток человека *in vitro*, однако при изучении патогенеза

гриппозной инфекции *in vivo* на мышах и хорьках, разницы между исходным и мутантным вариантом вируса обнаружено не было (Belser J. et al., 2010).

4.2.2. Дифференцированная индукция апоптоза в монослойных клеточных линиях вирусами гриппа А. Взаимоотношение вируса гриппа с клетками может протекать по нескольким сценариям. Развитие цитопатических изменений в клетках, сопровождающееся высокой продукцией инфекционного вируса, приводит к гибели инфицированных вирусом клеток. При этом гибель клеток может происходить в виде некроза, в результате развития воспалительного процесса, либо в виде апоптоза, т.е. программированной клеточной смерти (Манских В.Г., 2004).

Исследования, проведенные на клеточных линиях А-549, ECV-304 и ФЛЭЧ позволили установить дифференциальную индукцию апоптоза в этих клеточных линиях в зависимости от принадлежности вирусов гриппа А к тому или иному подтипу. Вирусы гриппа А подтипов А(Н5N1) и А(Н3N2) индуцировали наиболее быстрый и интенсивный апоптоз в исследуемых клеточных линиях, в то время как вирусы гриппа подтипов А(Н1N1) и А(Н1N1)pdm09 вызывали клеточную гибель лишь незначительной части клеточной популяции. Эти данные хорошо согласуются с исследованиями Морриса с соавторами (Morris S.J. et al., 1999), которые показали, что вирусы, содержащие нейраминидазу типа N2, индуцируют апоптоз более эффективно, чем штаммы с нейраминидазой типа N1. Однако в экспериментах этих исследователей не тестировались штаммы подтипа А(Н5N1), обладающие нейраминидазой типа N1, но являющиеся мощнейшими индукторами апоптоза в клеточных культурах человека и животных.

Известно, что среди вирусных белков, играющих роль в индукции апоптоза, особую роль отводят двум белкам: PB1-F2 и NS1. Хотя роль белка PB1-F2 в непосредственном влиянии на индукцию апоптоза сейчас обсуждается многими исследователями, стоит признать, что опубликованные работы напрямую указывают на его участие в смерти клеток (McAuley et al., 2010; Chakrabati A.K., Pasricha G., 2013). На рисунке 4.2. приведено сравнение аминокислотных

последовательностей белка PB1-F2 для штаммов, использованных в работе. Из приведенного выравнивания последовательностей видно, что только штамм птичьего гриппа A(H5N1) и вирусы гриппа A/Брисбен/10/07 (H3N2) и A/Пуэрто-Рико/8/34 кодируют полноразмерный белок PB1-F2, в то время как вирус гриппа свиней, вирус A/Брисбен/59/07 (H1N1) и вирус пандемического гриппа 2009 г. кодируют укороченные, функционально неактивные формы этого белка. Возможно, именно отсутствие полноразмерного белка PB1-F2 приводит к неспособности этих штаммов индуцировать апоптоз, сравнимый по интенсивности с вирусами гриппа подтипов A(H5N1) и A(H3N2).

NS1 - еще один вирусный белок, контролирующий программированную клеточную гибель путем апоптоза. Известно, что экспрессия полноразмерного белка NS1 в клетках MDCK и HeLa необходима и достаточна для индукции апоптоза в этих клеточных линиях (Schultz-Cherry S. et al., 2001). Для индукции апоптоза необходим полноценный РНК-связывающий домен белка NS1 (АК 19-38), а эффекторный домен (АК позиции 134-161) в индукции апоптоза не задействован, поскольку вирусы с укороченным эффекторным доменом индуцируют апоптоз также эффективно, как и штаммы дикого типа. Аминокислотные последовательности данного белка для изучаемых штаммов приведены на рисунке 4.3. Из приведенных последовательностей следует, что все использованные в работе штаммы кодируют полноразмерный белок NS1. Однако высокопатогенный вирус A/Курица/Курган/5/05 имеет делецию АК в позициях 80-84, которая не обнаруживается у других штаммов. По данным китайских исследователей, эта делеция является одним из важных факторов патогенности и связана с высокой вирулентностью штаммов гриппа птиц (Li W. et al., 2010). Еще одной аминокислотной мутацией, определяющей повышенную вирулентность вирусов гриппа подтипа A(H5N1) считают замену D92E, однако у вируса A/Курица/Курган/5/05 она не обнаружена.

	1	50	
A/chicken/Kurgan/5/05_PB1-f2	(1)	MGQGQDTPWTQST	HTNIQKRGSGQQTQRLEHPNSTRLMDHYLRIMSPVV
A/Brisbane/10/07_PB1-f2	(1)	MEQEQGTPWTQST	HTNIQRKGSGRQIQKLGHFNSTQLMDHYLRIMNQVD
A/Brisbane/59/07_PB1-f2	(1)	MGQEQDTPWIQST	GHTSTQKEEDGQKIPKLEHRNLTQLMVHYRKTMNQVA
A/PuertoRico/8/34_PB1-f2	(1)	MGQEQDTPWILST	GHISTQKREDGQQTPKLEHRNSTRLMGHCQKTMNQVV
A/Swine/1976/31_PB1-f2	(1)	-----	MDHCQKIMNRVV
A/California/07/09_PB1-F2	(1)	MEQEQDTPWTQ	-----
Consensus	(1)	MGQEQDTPWTQST HT	QKR GQQ KLEH NST LMDHY KIMNQVV
	51	90	
A/chicken/Kurgan/5/05_PB1-f2	(51)	MHKQIVYWKQ	WLSLKNPTQGLKTRVLKRWKLFNKQEWIN
A/Brisbane/10/07_PB1-f2	(51)	MHKQTVSWRL	WPSLKNPTQVSLRTHALKQWKPENRQGWTN
A/Brisbane/59/07_PB1-f2	(51)	MPKQIVY	-----
A/PuertoRico/8/34_PB1-f2	(51)	MPKQIVYWR	WLSLRNPILVFLKTRVLKRWRLFSKHE---
A/Swine/1976/31_PB1-f2	(13)	MPKQIVYWKQ	WLSLRSPVSLKTHALKRWKLFKHEWTS
A/California/07/09_PB1-F2	(12)	-----	-----
Consensus	(51)	MPKQIVYWK WLSLKNPT	VSLKT LKRWKLF K EW

Рисунок. 4.2. Предсказанные аминокислотные последовательности белка PB1-f2 вирусов гриппа А, использованных в работе.

Приводятся данные из GenBank. Номера последовательностей: ABD92951.1 - A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1); ADE28748.1 - A/Brisbane/59/2007(H1N1); ACI26327.1- A/Brisbane/10/2007(H3N2); ACV49554.1 - A/Puerto Rico/8-1/1934(H1N1); ACV52110.1 - A/swine/1976/1931(H1N1); ACP41958.1- A/California/07/09(H1N1)pdm

A/California/07/09_NS1	(1)	MDSNTMSSFQVDCFLWHVIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNL
A/Swine/1976/31_NS1	(1)	MDSNTVSSFQVDCFLWHVIRKRFADKKLGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTL
A/PuertoRico/8/34_NS1	(1)	MDSNTVSSFQVDCFLWHVIRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTL
A/Brisbane/10/07_NS1	(1)	MDSNTVSSFQVDCFLWHVIRKQVVDQELSDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNL
A/Brisbane/59/07_NS1	(1)	MDSHTVSSFQVDCFLWHVIRKQAADQDLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGSTL
A/Chic/Kurgan/5/05_NS1	(1)	MDSNTVSSFQVDCFLWHVIRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNL
Consensus	(1)	MDSNTVSSFQVDCFLWHVIRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTL
	51	100
A/California/07/09_NS1	(51)	GLDIETATLVGKQIVIEWILKEESSETLRMTIASVPTSRYLSDMTLEEMSR
A/Swine/1976/31_NS1	(51)	GLDIETATRAGKQIVERILEEESTGALKMTIASVPASRYLADMTLEEMSR
A/PuertoRico/8/34_NS1	(51)	GLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSR
A/Brisbane/10/07_NS1	(51)	GLDIKAATHVIGKQIVEKILKEESDEALKMTMVSTPASRYITDMTLEELSR
A/Brisbane/59/07_NS1	(51)	GLNIETATCVGKQIVERILKEESDEALKMTMASALASRYLTDMTVEEMSR
A/Chic/Kurgan/5/05_NS1	(51)	GLDIETATRAGKQIVERILEEES----DEALKMPASRYLTDMTLEEMSR
Consensus	(51)	GLDIETATRVGKQIVERILKEESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSR
	101	150
A/California/07/09_NS1	(101)	DWFMLMPKQKVIIGPLCVRLDQAIMEKNIYILKANFSVIFNRLETILLRAF
A/Swine/1976/31_NS1	(101)	EWFMMPNPKVAGSLYIRMDQAIMEKSIILKANFSVIFDRLETILLRAF
A/PuertoRico/8/34_NS1	(101)	DWSMLIPKQKQVAGPLCIRMDQAIMDKNIILKANFSVIFDRLETILLRAF
A/Brisbane/10/07_NS1	(101)	NWFMMPKQKVEGPLCIRMDQAIMEKNIILKANFSVIFDRLETIVLLRAF
A/Brisbane/59/07_NS1	(101)	DWFMLMPKQKQVAGPLCVRMDQAIMDKNIILKANFSVIFDRLENTLLRAF
A/Chic/Kurgan/5/05_NS1	(96)	DWFMLMPKQKQVAGPLCIRMDQAIMDKTIILKANFSVIFDRLETILLRAF
Consensus	(101)	DWFMLMPKQKQVAGPLCIRMDQAIMDKNIILKANFSVIFDRLETILLRAF
	151	200
A/California/07/09_NS1	(151)	TEEGAIVGEISPLSLPGHTYEDVKNAVGVLLIGGLEWNGNTVTVRVSSENQR
A/Swine/1976/31_NS1	(151)	TEEGAIVGEISPLSLPGHTDEEDVKNAVGVLLIGGLEWNDNTVTVRVSSENQR
A/PuertoRico/8/34_NS1	(151)	TEEGAIVGEISPLSLPGHTAEDVKNAVGVLLIGGLEWNDNTVTVRVSSENQR
A/Brisbane/10/07_NS1	(151)	TEEGAIVGEISPLSLPGHTIEDVKNAVGVLLIGGLEWNDNTVTVRVSSENQR
A/Brisbane/59/07_NS1	(151)	TEEGAIVGEISPLSLPGHTNEDVKNAVGVLLIGGLEWNDNTVTVRVSSENQR
A/Chic/Kurgan/5/05_NS1	(146)	TEEGAIVGEISPLSLPGHTNEDVKNAVGVLLIGGLEWNDNTVTVRVSSENQR
Consensus	(151)	TEEGAIVGEISPLSLPGHTEDVKNAVGVLLIGGLEWNDNTVTVRVSSENQR
	201	230
A/California/07/09_NS1	(201)	FAWRNCDENGRPSLPPEQK-----
A/Swine/1976/31_NS1	(201)	FAWRSRNENGRPSLPKQKWEVAGTIRSEV
A/PuertoRico/8/34_NS1	(201)	FAWRSSNENGRPPLTPKQKREMGATIRSEV
A/Brisbane/10/07_NS1	(201)	FAWRSSNENGGPPLTPKQKREMGATIRSEV
A/Brisbane/59/07_NS1	(201)	FAWRSSNETGGPPFTTTQKRKMAGTIRSEV
A/Chic/Kurgan/5/05_NS1	(196)	FAWRSIDEDGRLPLPDQKRKMARTIEPKV
Consensus	(201)	FAWRSSNENGRPPLTPKQKREMGATIRSEV

Рисунок. 4.3. Предсказанные аминокислотные последовательности белка NS1 вирусов гриппа А, использованных в работе.

Несмотря на то, что делеция NS1 в белке позициях 80-84 связана с повышенной вирулентностью вирусов гриппа А (H5N1), в опытах *in vitro* она не оказывала существенного влияния на индукцию апоптоза в клеточных линиях (Li W. et al., 2010). Более того, опубликованы работы, которые убедительно доказывают, что роль белка NS1 в контроле вирус-индуцированного апоптоза двояка. Так, немецкими исследователями было доказано, что в ходе жизненного цикла вируса белок NS1 связывается с киназой PI3K, что приводит к ее активации и

последующему фосфорилированию эффекторной киназы Akt (Ehrhardt C. et al., 2007). Активированная Akt ингибирует каспазу 9 и гликоген синтазу-киназу 3 β , что приводит к блоку путей, запускающих апоптоз. При этом вирусы с неполным белком NS1 не способны активировать PI3K, поскольку для этого необходим полноразмерный С-конец белка. Однако стоит отдельно упомянуть, что даже штаммы с полноразмерным и функциональным NS1 не способны полностью блокировать развитие апоптоза в ходе инфекции, а некоторые клеточные компоненты апоптозного пути необходимы для нормального протекания вирусной инфекции (Wurzer W.J. et al., 2003).

Еще одним важным свойством белка NS1 является его взаимодействие с клеточным фактором полиаденилирования CPSF30 (Ramos I. et al., 2013). Это свойство характерно для вирусов гриппа человека, однако у вирусов гриппа птиц, особенно подтипов H6 и H9 оно не поддерживается. Существует гипотеза о том, что способность NS1 связываться с CPSF30 определяет его адаптацию к определенному хозяину, однако биологическая роль этого взаимодействия установлена не до конца (Hale B. et al., 2010). Отметим, что у вирусов гриппа свиней, также, как и у вирусов пандемического гриппа 2009 г. в позициях 108, 125 и 189 белка NS1 расположены АК, отличные от вирусов эпидемического гриппа человека, и эти замены определяют неспособность белка NS1 связываться с CPSF30. Восстановление в этих позициях аминокислот, необходимых для взаимодействия с CPSF30 не приводило к более интенсивной репликации таких вирусов как в первичных, так и перевиваемых культурах клеток человека; вирус с модифицированным белком NS1 также не способен был эффективно подавлять противовирусный ответ клетки, что наблюдалось и для штамма пандемического гриппа 2009 г. дикого типа (Hale B. et al., 2010). Это говорит о том, что связывание NS1 с CPSF30 не является обязательным условием приспособления вируса к репликации в клетках нового хозяина. Подтверждением этому служит и тот факт, что у большинства вирусов «классического гриппа» свиней белок NS1 не способен

к эффективному взаимодействию с CPSF30; при этом данные вирусы стабильно циркулируют в свиной популяции почти 100 лет.

Таким образом, существует баланс между индукцией апоптоза (например, белком PB1-F2) и его блоком (за счет NS1) в ходе жизненного цикла вируса, который тонко контролируется сложнейшими механизмами взаимодействия вирусных и клеточных белков.

4.2.3. Активность нейраминидазы вирусов группа A(H1N1)pdm09.

Результаты тестирования активности NA в тесте с использованием флуоресцентно меченного субстрата MUNANA позволили продемонстрировать, что активность NA вирусов гриппа сильно варьирует, как в пределах одного подтипа вирусов по NA, так и между разными подтипами. Эти данные хорошо согласуются с данными литературы (Air G., 2012; Shtyrya Y.A. et al., 2009). Интересно, что для современных изолятов вирусов гриппа A(H3N2) установлено снижение активности NA вплоть до неопределяемых значений. Такие вирусы не ингибируются озельтамивиром и занамивиром, т.к. функциональная активность NA им не требуется. Они несут специфические мутации в NA в области рецептор-связывающего сайта, которые обеспечивают «слабое» связывание с рецептором: с одной стороны, достаточное, для проникновения вируса в клетку, а с другой стороны неспособное агрегировать вирусное потомство на поверхности клеток (McKimm-Breschkin J.L. et al., 1996). Более того, у некоторых вирусов NA приобретает дополнительное свойство: она может выступать в роли рецептор-связывающего белка (Lin Y.P. et al., 2010; Ноорет К.А., Влоом J.D., 2013). Известно, что нейраминидазы, относящиеся ко второй группе, содержат дополнительный сайт связывания сиаловых кислот, за счет чего такие вирусы можно выявить в реакции гемадсорбции. Однако в случае рецептор-связывающей функции NA активность этого сайта не востребована. Более того, в искусственных условиях был получен вирус с NA типа N1, который не обладает таким дополнительным сайтом, но выполняет рецептор-связывающую функцию. Эта способность блокируется добавлением озельтамивира, и такие вирусы полностью зависят от наличия полноценного NA для дальнейшего проникновения

вируса в клетку (Hooper K.A., Bloom J.D., 2013). Способность NA выступать в роли рецептор-связывающего белка определяется мутацией D151G для вирусов подтипа A(H3N2), у которых она широко распространена, и заменой G147R для вирусов гриппа, несущих N1. Для природных изолятов такая мутация была обнаружена у вирусов гриппа A(H5N1), A(H1N1), A(H1N1)pdm09 (Hooper K.A., Bloom J.D., 2013). Очень многие исследователи полагают, что снижение функциональной активности NA связано с выделением/культивированием вирусов в клеточных системах или куриных эмбрионах, полагая что у исходных вирусных штаммов активность NA выше. Однако полномасштабных исследований по вирусам гриппа различных подтипов пока не проведено.

Наши данные не выявили зависимости активности NA от системы выделения вируса; только для вирусов гриппа птиц подтипа A(H5N1) активность NA КЭ-штамма была значимо выше, чем для его MDCK-варианта. Интересно, что активность NA вирусов гриппа свиней, также, как и вирусов пандемического гриппа 2009 г., сильно варьировала, и эта вариация не может быть объяснена с точки зрения анализа первичных аминокислотных последовательностей NA. В целом, активность NA вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных как от человека, так и от свиней, статистически не отличалась от таковой для NA вирусов сезонного гриппа A(H1N1) человека и свиней, и была ниже, чем активность NA N1 вирусов гриппа птиц и вирусов гриппа птиц и человека подтипа N2.

4.3. Антигенные свойства и генетическое разнообразие вирусов A(H1N1)pdm09, определяемое поверхностными белками вирусов гриппа.

4.3.1. Антигенный анализ вирусов гриппа A(H1N1)pdm09. Антигенный анализ вирусов, выделенных за изучаемый период, показал, что большинство проанализированных штаммов антигенно однородны. Эти данные подтверждаются и данными СЦ центров ВОЗ в Лондоне и в Атланте (WHO, 2009-2013). По данным сотрудничающих центров большинство вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных в период 2009-2013 гг. были подобны эталонному штамму A/Калифорния/07/09 (WHO 2009,2010,2011,2012,2013). Поскольку сотрудничающие центры получают

вирусы из разных регионов мира, неудивительно, что среди всех полученных изолятов были зарегистрированы и дрейф-варианты А/Калифорния/07/09, реагирующие с антисывороткой к данному эталонному штамму до 1/8 гомологичного титра. В разные сезоны доля таких штаммов была различна, но в среднем составляла 8-12%. При этом, подобные изоляты не получили распространения в мире, поскольку согласно последнему отчету, подготовленному к совещанию ВОЗ по вакцинным штаммам для северного полушария 2014-2015 гг. большинство выделяемых современных вирусов А(Н1N1)рdm09 по-прежнему антигенно подобны штамму А/Калифорния/07/09 (WHO, 2014). В этой связи, в состав тривалентной гриппозной вакцины в качестве компонента А(Н1N1)рdm09 в пятый раз подряд рекомендован штамм, подобный А/Калифорния/07/09.

Возникает закономерный вопрос: почему за пятилетний период активной циркуляции в мире вирусы А(Н1N1)рdm09 не приобрели значимых антигенных отличий? Связано ли это с низким уровнем популяционного иммунитета к возбудителю, а потому отсутствию давления отбора, или же проявляется характерная для вирусов подтипа Н1N1 тенденция «молчащей» изменчивости, которая приведет к быстрому и неожиданному появлению антигенно-отличных вариантов? Этот вопрос еще ждет своего разрешения. Однако еще раз стоит отметить, что ни один из дрейф-вариантов вирусов А(Н1N1)рdm09 пока не закрепился в популяции циркулирующих вирусов. Каждый год на протяжении всего периода циркуляции отмечаются новые варианты, которые сменяются другими «нетипичными» штаммами, в то время как большинство вирусов в популяции антигенно родственны эталонному штамму А/Калифорния/07/09. Однако определенная гетерогенность по антигенному составу в популяции все же формируется. Так, обнаруживаемые различия при взаимодействии отдельных штаммов с сыворотками разных способов получения (к МДСК или КЭ вариантам вируса) или разного происхождения (крысиные или хорьковые) могут указывать на постепенно возникающую, но пока еще редкую, неоднородность вирусной популяции начального периода циркуляции вирусов. Весьма вероятно, что у вирусов

более позднего периода эта неоднородность будет более выражена. Более того, ярким примером неоднородности вирусной популяции вирусов A(H1N1)pdm09 является свойство ингибиторочувствительности/резистентности, обнаруживаемое при взаимодействии с прогретой лошадиной сывороткой в РТГА. Данные литературы свидетельствуют, что большинство пандемических вирусов обладали ингибиторорезистентным фенотипом, который характерен и для эталонного вируса А/Калифорния/07/09 (Kiseleva I. et al., 2009). В то же время среди эпидемических изолятов A(H1N1)pdm09 встречаются как ингибиторорезистентные, так и ингибиторочувствительные штаммы, причем пропорция этих вирусов примерно равна. Такие вирусы не демонстрируют антигенных отличий в РТГА, и способность к реагированию с лошадиной сывороткой – это единственная отличающая их характеристика.

Антигенное картирование, проведенное на основании РТГА, позволило показать, что вирусы A(H1N1)pdm09 2009-2013 гг. выделения формируют плотные кластеры вокруг референс-штаммов, расстояние на антигенной карте при этом не превышает $\frac{1}{4}$ гомологичного титра. Антигенная карта также позволяет отобразить разную эволюционную дистанцию между вирусами пандемического гриппа 2009 г, современными вирусами гриппа свиней подтипа A(H1N1) и эволюционно более старыми вирусами гриппа свиней A(H1N1) 1930-хх гг. выделения. Видно, что чем «старше» вирусы, тем дальше они отстоят на карте друг от друга. При этом, поскольку эволюция вирусов гриппа свиней протекает медленнее таковой для вирусов гриппа человека, вирус А/Нью Джерси/8/76 отладает антигенными отличиями от современных штаммов пандемического гриппа всего в $\frac{1}{8}$ гомологичного титра несмотря на почти 40-летнюю эволюционную дистанцию.

Исходя из вышесказанного можно заключить, что большинство вирусов A(H1N1)pdm09 в России и в мире за весь период циркуляции были антигенно однородными. Отдельные методические подходы позволяют выявить гетерогенность среди циркулировавших штаммов, однако в настоящий момент она слабо выражена, что, возможно, связано с недолгим периодом циркуляции вирусов

данного подтипа в человеческой популяции, либо же отражает характерную «молчащую» изменчивость, описанную для вирусов сезонного гриппа А(H1N1).

4.3.2. Генетическое разнообразие вирусов гриппа А(H1N1)pdm09. Анализ первичной структуры аминокислотных последовательностей HA и NA вирусов пандемического гриппа 2009 г., выделенных в России, позволил продемонстрировать, что все исследованные изоляты обладали заменами, характерными для штаммов, выделенных и в других странах. Российские штаммы не обладали уникальными, характерными только для данной территории заменами, хотя еще раз отметим, что генетические группы 5,6 и 7 представлены референс-штаммами, изолированными в России. Эти группы широко циркулировали по миру, как в северном, так и южном полушарии, а группа 6 в настоящий момент представлена как минимум тремя разнообразными подгруппами (WHO, 2011-2013). За исследованный период нами не было зарегистрировано вирусов, принципиально отличающихся по АК последовательности от штаммов, циркулирующих в мире. Интересно, что в сезон 2012-2013 гг. на Африканском континенте была зарегистрирована группа вирусов, несущая реверсивную мутацию P203S (WHO, 2013). Мутация в 203 положении – одна из наиболее ранних, среди отмеченных для HA вирусов пандемического гриппа 2009 г., и она присутствовала у всех штаммов, охарактеризованных с 2009 г. Такие ревертанты не отличались антигенно от изолятов, несущих S203P, однако о других характеристиках этих вирусов дополнительной информации нет.

Среди мутаций, определяющих антигенные отличия в РТГА, наиболее часто встречаются замены в 154-156 положениях HA. Такие штаммы были выделены по всему миру, в том числе и в России (А/Санкт-Петербург/204/09, А/Санкт-Петербург/45/11, и др.). Из отечественных изолятов интересен был штамм А/Астрахань/35/11 несущий очень нетипичную замену D222A. Среди российских штаммов ни один другой вирус не обладал подобной заменой, которая для данного штамма определяла его антигенное отличие в РТГА. Из данных литературы четко следует, что замены в 222 положении напрямую влияют на рецептор-связывающие

свойства вирусов A(H1N1)pdm09, и у человека такие мутантные вирусы вызывают тяжелое течение заболевания, в то время как на животных моделях это не всегда удавалось показать (Belser J. et al., 2010). Замены в этом положении встречались и у сезонных вирусов A(H1N1) и в эквивалентном положении 225 у вирусов гриппа A(H3N2), однако для этих вирусов не было выявлено однозначной связи между изменением рецепторной специфичности и тяжестью заболевания, вызываемого подобными изолятами.

Интересно отметить, что вирусная популяция в организме больного гетерогенна, и в некоторых исследованиях было показано, что вирусный материал изначально содержит «смесь» вариантов D222, G222 и возможно другие, а селекция того или иного преобладающего варианта протекает по мере развития инфекции (Львов Д.К. и др., 2010а, 2010в).

Интересной особенностью российских изолятов стал тот факт, что ни одна из обнаруженных АК мутаций не затронула известные потенциальные сайты гликозилирования в молекуле НА. Это необычно, ведь известно, что утрата или приобретение сайтов гликозилирования позволяют вирусам ускользать от иммунного ответа. Установлено, что у вирусов гриппа человека с НА подтипа Н1, имеется в среднем 7-9 сайтов гликозилирования, из которых 4 расположены на верхушке молекулы НА. При этом Н1 вирусов гриппа свиней и птиц не содержит этих сайтов гликозилирования (Schultze I., 1997). Сайты гликозилирования и их количество во многом зависят от системы выделения вируса (тип клеточной культуры, или КЭ), однако в целом отмечено, что вирусы гриппа человека подтипа Н1 имеют тенденцию к сохранению большинства сайтов гликозилирования, в то время как вирусы гриппа птиц и свиней элиминируют эти сайты с верхушки НА. К сожалению, подробного анализа сайтов гликозилирования для вирусов пандемического гриппа не проведено, установлены лишь потенциальные сайты гликозилирования, число которых соответствует таковым для вирусов, несущих Н1.

Подводя итог антигенному и генетическому разнообразию вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 по NA необходимо заметить, что антигенное однообразие этих штаммов сопровождается достаточно выраженным генетическим разнообразием. При этом методы соответствующие методы картирования (антигенное и филогенетическое) пока нельзя сопоставить между собой, ввиду очень малой антигенной дистанции на карте. Известно, что вирусы, обладающие большим антигенным разнообразием, хорошо формируют четкие группы, которые можно детерминировать как на антигенной карте, так и на филогенетическом дереве, и соотнести их между собой (Smith D. et al., 2004). Однако для вирусов пандемического гриппа такое соотнесение результатов пока провести невозможно.

Гетерогенность вирусной NA была менее выраженной, чем у HA. Это подтверждается и отсутствием четкой детекции сайтов, подверженных позитивной селекции с использованием современных методов биоинформатики. Заметим, что активность NA современных штаммов А(Н1N1)pdm09 не всегда может быть объяснена с точки зрения последовательности. Так, штамм А/Москва/18/13 несет многие замены в NA, отличающие его от других изолятов этого сезона, однако активность NA этого штамма сопоставима с другими вирусами А(Н1N1)pdm09. Вирусы, резистентные к озельтамивиру, демонстрируют пониженную активность NA, что известно из данных литературы (Baranovich T. et al., 2011), однако подобные значения активности отмечены и для штаммов, не имеющих резистентный фенотип. Однако большинство вирусов, протестированных нами, обладали NA активностью, что свидетельствует о ее функциональной роли для штаммов А(Н1N1)pdm09. Ни у одного из изученных вирусов не была выявлена мутация G147R, приводящая к изменению функциональной нагрузки NA. Более того, среди всех изученных вирусов, лишь один – А/Санкт-Петербург/151/2013 оказался резистентным к озельтамивиру. Отметим, что тестирование всех выделенных штаммов на чувствительность к ингибиторам нейраминидазы не входило в задачи этого исследования, однако из данных литературы известно, что уровень резистентности современных вирусов А(Н1N1)pdm09 к озельтамивиру и

другим ингибиторам нейраминидазы невысок и колеблется в пределах нескольких процентов от всех протестированных изолятов (Brookes D.W. et al., 2011; Air G., 2012).

Подводя итог, заметим, что российские вирусы A(H1N1)pdm09 обладали заменами в HA и NA, характерными для штаммов, выделенных в других странах в 2009-2013 гг. Особенностью российских штаммов стало отсутствие мутаций, затрагивающих потенциальные сайты гликозилирования, которые были описаны для изолятов других регионов.

4.4. Возможные пути эволюции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09.

Исходя из полученных данных об антигенной однородности вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных в России и в мире, и наблюдаемом генетическом разнообразии, встает вопрос о дальнейшей эволюции вирусов гриппа A(H1N1)pdm09. Среди возможных перспектив стоит отметить, как минимум, три возможных пути. Вирусы данного подтипа могут продолжать циркулировать среди населения, постепенно накапливая мутации за счет антигенного дрейфа, и закрепиться таким образом в популяции, заняв место сезонных вирусов A(H1N1). Возможен уход из циркуляции этих вирусов, однако не ясно, должно ли это сопровождаться полным вытеснением из циркуляции вирусов A(H1N1)pdm09 или же их уход из циркуляции будет связан с приходом антигенно нового вируса, обладающего большим потенциалом к распространению среди населения. Еще один вариант связан с резким изменением свойств вирусов A(H1N1)pdm09 за счет принципиального антигенного дрейфа или же шифта (или рекомбинации, но это маловероятное событие), который спровоцирует распространение нового вируса за счет иммунологической «наивности» населения, как это было в 2009 г.

Хотя принято считать, что вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 содержат в своем геноме генетические сегменты от вирусов гриппа свиней, птиц и человека (PB1) (Garten R. et al., 2009) необходимо отметить, что комбинация этих сегментов в составе A(H1N1)pdm09 еще до его образования не встречалась в популяции людей или птиц, а циркулировала среди свиней в составе различных реассортантов.

Происхождение A(H1N1)pdm09 связывают с реассортацией вирусов гриппа свиней A(H1N1) евразийской линии (доноры сегментов NA и M) и тройных реассортантов гриппа свиней подтипа A(H3N2), циркулировавших в США и Канаде с 1998 г. (Ma Q. et al., 2014; Garten R. et al., 2009; Morens D.M. et al., 2011). Пути образования пандемических вирусов, включая штамм 2009 г., показаны на рисунке 4.4.

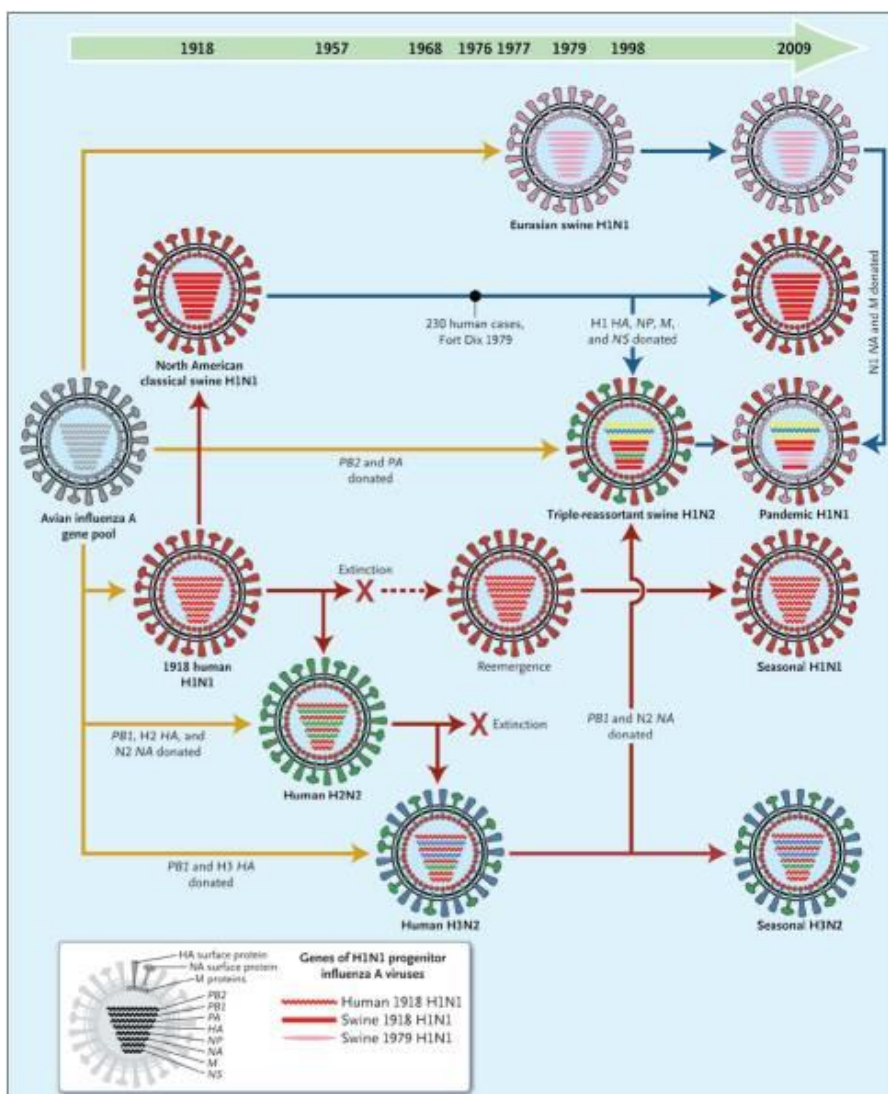


Рисунок 4.4. Пути образования современных вирусов гриппа человека и свиней (по работе Morens D.M. et al., 2009).

Интересно, что попытка реконструировать события, приведшие к возникновению штаммов A(H1N1)pdm09 в лабораторных условиях не удалась (Ma Q. et al., 2014). При одновременном заражении клеточных культур и свиней

вирусами гриппа свиней евразийской линии и тройными реассортантными вирусами А(Н3N2), были получены многочисленные реассортанты, как в клеточных линиях, так и выделенные от свиней, однако ни один из них не напоминал по составу генетических сегментов А(Н1N1)pdm09, что позволило авторам прийти к выводу, что возникновение А(Н1N1)pdm09 в природных условиях – редкое событие, потребовавшее специальных (не ясных на сегодняшний день) условий.

Свиньи рассматриваются как «смешивающий сосуд» для возникновения новых вирусов гриппа, способных поражать человека еще с 80-х годов прошлого века, однако как уже упоминалось, передача свиных вирусов к человеку – достаточно редкое событие, или, по крайней мере, было таковым до появления А(Н1N1)pdm09 (Schultz-Cherry S. et al., 2011). Самое интересное, что, будучи зоонозным по своему происхождению штаммом, А(Н1N1)pdm09 от людей вернулся в популяцию свиней, где закрепился и активно циркулирует по настоящее время (Zhu H. et al., 2013). Более того, отмечены многочисленные случаи передачи этого вируса индейкам, домашним животным (кошкам, собакам, хорькам), но не уткам и курам (Choi Y.-K. et al., 2013). Как обсуждалось в литературном обзоре, эволюция вирусов гриппа свиней идет медленнее, чем эволюция вирусов гриппа человека, однако у них есть одна принципиальная особенность, особенно ярко выраженная в последнее время, которая заставляет пересмотреть взгляды на эволюцию свиных вирусов. Вирусы гриппа свиней обладают очень мощным потенциалом к реассортации, и это приводит к возникновению в свиных популяциях вирусов с совершенно необычным составом генетических сегментов. Стоит лишь упомянуть, что помимо разнообразных линий подтипов Н1N1 и Н3N2, от свиней в разное время были выделены вирусы подтипов Н1N2, Н1N3, Н2N3, Н3N1, Н4N6, Н1N7, Н5N2, Н11N6, Н6N6, Н4N6, Н9N2 (Zhu H. et al., 2013). Этот список содержит лишь вирусы, различающиеся по двум сегментам, кодирующим поверхностные белки вируса, а если принять во внимание и внутренние сегменты, – то вариации будут значительно больше. Важным аспектом такой массовой

реассортации являются два фактора: 1) большинство реассортантных вирусов гриппа свиней выделено в Азии, где поголовье свиней наиболее высоко в мире; в этой связи азиатские страны считают «центром разнообразия» гриппа свиней 2) очень небольшое количество из упомянутых реассортантов закрепилось в популяции свиней и продолжает активно циркулировать (H1N1, H1N2, H3N2, H3N1), а все остальные варианты выделяются лишь спорадически. Еще один факт, вызывающий беспокойство в отношении вирусов гриппа свиней, заключается в том, что они способны быть «носителями» вирусов высокопатогенного гриппа A(H5N1) без проявления признаков заболевания (как и многих других подтипов), но при этом, если возникают реассортантные вирусы, содержащие гены от A(H5N1), они вызывают у свиней выраженную клиническую картину болезни (Mahardika I.G.N., 2008; Takano R. et al., 2009).

Приведенные факты об эволюции и реассортации вирусов гриппа свиней позволяют сделать несколько предположений о дальнейшей судьбе вирусов A(H1N1)pdm09, как исходно «свиного» штамма. Во-первых, как и все другие вирусы, циркулирующие среди свиней, A(H1N1)pdm09 активно участвует в реассортации с другими вирусами гриппа свиней и птиц, что подтверждено многочисленными данными о выделении таких реассортантных вирусов. Во-вторых, за прошедший период с 2009 по 2013 гг. зарегистрированы несколько случаев заболевания человека вирусами гриппа свиней A(H1N1)pdm09, а также новыми реассортантными вирусами A(H3N2)v, что ставит вопрос о возможной передаче и распространении в человеческой популяции и других «свиных» реассортантов. Более того, установлено, что коинфекция людей вирусами A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) происходит в 0,5-3% случаев, что также ставит вопрос о возможной реассортации вирусов (Ghedini E. et al., 2009; 2011; Lee N. et al., 2010). Интересно при этом отметить, что инфицирование людей вирусами гриппа свиней чаще отмечается в США и Канаде, чем в Азиатских странах, где описаны всего несколько случаев, однако большинство исследователей сходится во мнении, что

это лишь свидетельствует о недостаточном уровне мониторинга за такими случаями заражения.

Принимая во внимание все эти факторы, стоит признать, что уход вирусов А(Н1N1)pdm09 из циркуляции маловероятен, т.к. эти штаммы активно циркулируют как в популяции людей, так и свиней. Явления массовой реассортации, в том числе и с вирусами гриппа птиц (как низкопатогенными, так и высокопатогенными), позволяют подтвердить опасения экспертов о возможном возникновении новых реассортатных штаммов вирусов гриппа в свиньях с потенциалом к эффективной трансмиссии к человеку (Choi Y.-K. et al., 2013). Регистрируемые случаи заболевания людей «свиными» штаммами вирусов гриппа также подтверждают такую возможность, однако низкая частота таких случаев снижает реальную вероятность этого события. Скорее всего, вирусы А(Н1N1)pdm09 закрепятся в популяции людей и будут эволюционировать подобно предыдущим разновидностям вирусов А(Н1N1), постепенно накапливая изменения в различных участках HA и NA, с резким возникновением антигенно новых вариантов. Так, например, после реинтродукции вирусов А(Н1N1) в 1976/1977 гг., их антигенные характеристики оставались неизменными вплоть до 1983 г., когда было зарегистрировано появление принципиально отличных вариантов, подобных А/Чили/83, от вирусов, циркулировавших ранее.

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. Для решения поставленных задач были применены классические вирусологические методы, используемые при выделении вирусов гриппа, при получении поликлональных крысиных антисывороток и постановке РТГА для проведения антигенного анализа изучаемых вирусов гриппа. Для анализа биологических свойств вирусов A(H1N1)pdm09 были также использованы методы световой люминесцентной микроскопии с применением интеркалирующего в ДНК красителя Hoechst-33258, что позволило определить апоптотические индексы для штаммов вирусов гриппа различного происхождения. Использование разнообразных биохимических методик (использование флуоресцентных красителей для детекции апоптоза и уровня жизнеспособности клеток, тест MUNANA) позволили получить дополнительные характеристики биологической активности вирусов A(H1N1)pdm09. Для анализа генетического разнообразия исследуемых штаммов были применены современные методы молекулярной биологии и компьютерного анализа, что позволило детально проанализировать первичные аминокислотные последовательности в поверхностных белках вирусов A(H1N1)pdm09 – HA и NA. Наконец, применение методов компьютерного моделирования и анализа позволило создать антигенные карты современных изолятов A(H1N1)pdm09 и провести анализ сайтов в HA и NA, подвергающихся действию позитивной селекции.

Проведенные исследования позволили установить, что с момента появления вирусов пандемического гриппа в России летом 2009 г. наблюдалась их активная циркуляция на территории РФ за весь проанализированный период за исключением эпидемического сезона 2011-2012 гг. Было отмечено, что для вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 наблюдается тенденция к более предпочтительному размножению на куриных эмбрионах, чем на клеточной культуре MDCK. При выделении вирусов гриппа из секционных материалов КЭ предпочтительной системой выделения являлись куриные эмбрионы, как с точки

зрения эффективности выделения вирусов, так и с точки зрения быстроты получения результата. Использование альтернативных клеточных линий (MDCK-Siat1, CaCo-2) не позволило улучшить результаты выделения вирусов гриппа ни при работе с материалами от больных, ни при выделении из секционных материалов.

По результатам тестирования ряда биологических свойств вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 было установлено, что вирусы данного подтипа репродуцировались в большинстве перевиваемых клеточных линий человеческого происхождения с меньшей интенсивностью, чем вирусы гриппа человека подтипов A(H1N1), A(H2N2), A(H3N2), и вирусы гриппа птиц подтипа A(H5N1). Протестированные штаммы подтипа A(H1N1)pdm09 были слабыми индукторами апоптоза в линиях карциномы легкого человека A-549, эндотелиальной линии ECV-304 и диплоидной линии фибробластов человеческого эмбриона ФЛЭЧ по сравнению с вирусами гриппа птиц и вирусами гриппа человека A(H3N2). В этом отношении их свойства были схожи с вирусами гриппа свиней, протестированных для сравнения в эксперименте. Активность нейраминидазы вирусов пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 не превосходила таковую для эпидемических штаммов гриппа и вирусов гриппа свиней. Наиболее выраженная репродукция в клеточных линиях человека была отмечена для вирусов подтипа A(H5N1), для которых была характерна и более высокая активность нейраминидазы, и наиболее быстрая и интенсивная индукция апоптоза среди всех протестированных вирусов гриппа птиц, свиней и человека

Антигенный анализ вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных за пятилетний период, показал их антигенную однородность. Обнаруживаемые различия при взаимодействии с сыворотками разных способов получения и разной хозяйской принадлежности, возможно, указывают на постепенно возникающую, но пока еще антигенно невыраженную, неоднородность вирусной популяции начального периода циркуляции A(H1N1)pdm09. Результаты антигенного картирования подтверждают данные, полученные в РТГА.

Проведенный генетический анализ показал, 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 постоянном давлении отбора на вирусную популяцию, что приводит к постоянным изменениям в поверхностных белках вируса, и способствует отбору штаммов, обладающих 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. 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. 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).
3. Антигенный анализ вирусов A(H1N1)pdm09, выделенных в России в 2009-2013 гг., выявил их антигенную однородность. Антигенное единообразие исследованных штаммов подтверждают данные антигенного картирования.
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 вблизи рецептор-связывающего сайта (позиция 222), антигенном сайте C_b (позиция 83), S_b (154-155) 203, 321, 499. Большинство из

них не влияет на антигенные и биологические свойства вирусов за исключением замен в 154-155 положениях. В NA основные изменения зафиксированы для позиций 106, 248 и 351; большинство аминокислотных изменений расположены вне известных антигенных областей и каталитического сайта фермента.

5. Давление отбора на NA наиболее выражено для позиций 222 и 223, влияющих на рецептор-связывающие свойства вирусов A(H1N1)pdm09, а также позицию 374, определяющей стабильность тримера NA. Действие позитивной селекции в отношении NA вирусов гриппа на данном этапе циркуляции вирусов не выражено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соминина А. А. Выявление антител к вирусам гриппа А (H5N1) в сыворотках людей и животных при естественной инфекции и вакцинальном процессе в реакции микронеutralизации: Метод. рекомендации / А. А. Соминина, В. З. Кривицкая, Н. В. Третьякова и др. — СПб., 2009.— 26 с.
2. Говоркова Е.А. Селнкция клетками хозяина антигенных вариантов гемагглютини́на вирусом гриппа и выбор оптимальных систем для культивирования / Е.А. Говоркова // *Вопр. Вирусол.* – 1999. – Т. 43, №5. – С. 199-206.
3. Голубев Д. Споры и размышления о вирусах / Д. Голубев, В. Солоухин — М.: Молодая гвардия, 1989. – 226 с.
4. Дерябин П.Г. Спектр клеточных линий позвоночных, чувствительных к высокопатогенным вирусам гриппа А/крячка/Южная Африка/61 (H5N3) и А/крячка/Новосибирск/56/05 (H5N1) / П.Г. Дерябин, Д.К. Львов, Е.И. Исаева и др. // *Вопр. Вирусол.* – 2007. – Т. 51, №1. – С. 45-48.
5. Дубровина И.А. Трансмиссивность современных штаммов вирусом гриппа в экспериментах *in vivo* / И.А. Дубровина // *Дисс...канд. биол. наук.03.02.02.* защищена 20.12.2013. – СПб., 2013. – 157 С.
6. Жирнов О.П. Внутриклеточное расщепление гемагглютини́на вируса гриппа А человека и его ингиирование / О.П. Жирнов, И.В. Воробьева, А.В. Овчаренко и др. // *Биохимия.* – 2003. – Т. 68, №3. – С. 1247-1255.
7. Жирнов О.П. Патогенетическое действие пандемического вируса гриппа P1T1 при размножении в культурах клеток человека / О.П. Жирнов, И.В. Воробьева, О.А. Сафонова и др. // *Вопр. Вирусол.* – 2013. – Т. 57, №3. – С. 20-27.
8. Киселев О.И. Пандемический грипп 2009 г. в России. Диагностика и молекулярно-биологические характеристики вируса / О.И. Киселев, А.Б. Комиссаров, М.А. Стукова и др. // *Вопр. Вирусол.* – 2011. – Т. 56, №1. – С. 17-21.

9. Львов Д.К. Развитие эпидемии гриппа в сезоне 2011-2012 гг на отдельных территориях России. Итоги деятельности Центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России / Д.К. Львов, Е.И. Бурцева, Л.В. Колобухина и др. // Вопр. Вирусол. – 2013. – Т. 58, №2. – С. 15-20.
10. Львов Д.К. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа A/H1N1sw1 в рецепторсвязывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютиниана / Д.К. Львов, Е.И. Бурцева, А.Г. Прилипов и др. // Вопр. Вирусол. – 2010а. – Т. 55, №4. – С. 4-9.
11. Львов Д.К. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009) первого штамма A/IV-Moscow/01.2009 (H1N1)sw1, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 больного в Москве / Д.К. Львов, Е.И. Бурцева, А.Г. Прилипов и др. // Вопр. Вирусол. – 2009. – Т. 54, №5. – С. 10-14.
12. Львов Д.К. Распространение нового пандемического вируса гриппа A(H1N1)v в России / Д.К. Львов, Е.И. Бурцева, М.Ю. Щелканов и др. // Вопр. Вирусол. – 2010б. – Т. 55, №3. – С. 4-9.
13. Львов Д.К. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, изолированных в 2009-2011 гг, структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонией / Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов, Н.В. Бовин и др. // Вопр. Вирусол. – 2012. – Т. 57, №1. – С. 14-19.
14. Львов Д.К. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютиниана в вариантах пандемического вируса гриппа A/H1N1 от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания / Д.К. Львов, К.Б. Яшкулов, А.Г. Прилипов и др. // Вопр. Вирусол. – 2010в. – Т. 55, №3. – С. 15-20.
15. Манских В.Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза / В.Н. Манских // Бюлл. Сибирской Медицины. – 2004. – Т. 1. – С. 63-69.

16. Покровский В.И. Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф / под ред. В.И. Покровского, Л.С. Сандахгиева, В.В. Малеева и др. – СПб.: изд-во «Росток», 2012. – 358 С.
17. Смородинцев А.А. Гипотезы и факты о происхождении пандемических штаммов вируса гриппа А / А.А. Смородинцев // Вопр. вирусол. – 1975. - №1. – С. 105-113.
18. Смородинцев А.А. Грипп и его профилактика: (руководство для врачей) / А.А. Смородинцев / АМН СССР. – Л.: Медицина, 1984. – 384 с.
19. Смородинцев А.А. Возвращение вируса гриппа А1 и проблема происхождения пандемических вирусов / А.А. Смородинцев, Т.Я. Лузянина, Н.А. Иванова // Вопр. Вирусол. – 1979. – Т.24, №1. – С. 87-91.
20. Щелканов М.Ю., Львов Д.Н., Федякина И.Т. и др. Динамика распространения пандемического гриппа А/Н1N1 sw1 на Дальнем Востоке в 2009 г // Вопр. Вирусол. – 2010. – Т. 55, №3. – С. 10-15.
21. Abdussamad J. The non-adaptive nature of the H1N1 2009 Swine Flu pandemic contrasts with the adaptive facilitation of transmission to a new host / J. Abdussamad, S. Aris-Brosou // BMC Evol. Biol. – 2011. – V. 11. – P. 6.
22. Air G. Influenza neuraminidase / G. Air // Influenza and other respiratory diseases. – 2012. – V. 6. – P. 245-256.
23. Akaike H. A new look at the statistical model identification / H. Akaike // Automatic Control, IEEE Transactions on. – 1974. – V. 19. ,№. 6. – P. 716-723.
24. Arias C.F. Molecular anatomy of the 2009 influenza virus A(H1N1) / C.F. Arias, M. Escalera-Zamudio, M. de los Dolores Soto-Del Rio et al. // Arch. Med. Res. – 2009. – V. 40. – P. 643-654.
25. Arunachalam R. Genetic ancestor of external antigens of pandemic influenza A/H1N1 virus / R. Arunachalam, K. Paulkumar, G. Annadurai // Interdiscip. Sci. Comp. Life. Sci. – 2012. – V. 4. – P. 282-290.
26. Babiuk S. 1918 and 2009 H1N1 influenza viruses are not pathogenic in birds / S. Babiuk, R. Albrecht, Y. Berhane et al. // J. Gen. Virol. – 2010. – V. 91. – P. 339-342.

27. Baranovich T. Fitness of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses / T. Baranovich, R.G. Webster, E.A. Govorkova // *Curr. Opin. Virol.* – 2011. – V.1. – P. 574-581.
28. Belser J. Effect of D222G mutation in the hemagglutinin protein on receptor binding, pathogenesis and transmissibility of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus / J. Belser, A. Jayaraman, R. Raman et al. // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – P. e25091.
29. Belser J.A. Ocular tropism of respiratory viruses / J.A. Belser, P.A. Rota, T.M. Tumpey // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2013. – V. 77. – P. 144-156.
30. Belser J.A. Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses/ J.A. Belser, K.J. Szretter, J.M. Katz et al. // *Adv. Virus Res.* – 2009. – V. 73. – p. 55-97.
31. Boni M.F. Homologous recombination is very rare or absent in human influenza A virus / M.F. Boni, Y. Zhou, J.F. Taubenberger, E.C. Holmes // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – P. 4807-4811
32. Bouvier N.M. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission / N.M. Bouvier, A.C. Lowen // *Viruses.* – 2010. – V. 2. – P. 1530-1563.
33. Brookes D.W. Pandemic H1N12009 influenza virus with the H275Y oseltamivir resistance neuraminidase mutation shows a small compromise in enzyme activity and viral fitness / D.W. Brookes, S. Miah, A. Lackenby et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – V. 66. – P. 466-470.
34. Brown I.H. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A viruses of H1N2 subtype / I.H. Brown, P. Chakraverty, P. Harris, D.J. Alexander // *Vet. Rec.* – 1995. – V. 136. – P. 328-329.
35. Brown I.H. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in emergence of an H1N2 virus of novel genotype / I.H. Brown, P. Harris, J.W. McCauley, D.J. Alexander // *J. Gen. Virol.* – 1998. – V. 79. – P. 2947-2955.

36. Brownlee G.G. The predicted antigenicity of the hemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin / G.G. Brownlee, E. Fodor // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2001. – V. 356.- P. 1871-1876.
37. Castrucci M.R. Biological importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus / M.R. Castrucci, Y. Kawaoka // *J. Virol.* – 1993. – V. 67. – P. 759-764.
38. Chakrabati A.K. An insight into the PB1-f2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses / A.K. Chakrabati, G. Pasricha // *Virology.* – 2013. – V. 440. – P. 97-104.
39. Chang L.-Y. Novel swine-origin influenza virus A(H1N1): the first pandemic of the 21st century / L.-Y. Chang, S.R. Shih, P.-L. Shao et al. // *J. Formos. Med. Assoc.* – 2009. – V. 108. – P. 526-532.
40. Chen C.J. 2010. Differential localization and function of PB1-F2 derived from different 519 strains of influenza A virus / C. J. Chen, G. W. Chen, C. H. Wang // *J. Virol.* – 2010. - V. 84. – P. 10051-10062.
41. Chen H. Polygenic virulence factors involved in pathogenesis of 1997 Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice / H. Chen, R.A. Bright, K. Subbarao et al. // *Virus Res.* – 2007. – V. 128. – P. 159-163.
42. Chen L.M. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses / L.M. Chen, C. Davis, H. Zhou et al. // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4. – P. e.1000072.
43. Chen W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death / W. Chen, P.A. Calvo, D. Malide et al. // *Nat. Med.* – 2001. – V.7. – P. 1306-1312.
44. Chiapponi C. Comparison of the usefulness of the CaCo-2 cell line with standart substrates for isolation of swine influenza A viruses / C. Chiapponi, I. Zanni, C. Garbarino et al. // *J. of Virol. Methods.* – 2010. – V. 163. – P. 162-165.
45. Childs R.A. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray / R.A. Childs, A.S. Palma, S. Wharton et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2009. – V. 9. – P. 797-799.

46. Choi Y.-K. Swine influenza viruses: an Asian perspective / Y.-K Choi., P.N.Q Pascua., M.-S. Song // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. – V. 370. – P. 141-147.
47. Chutinimitkul S. Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza among infants and children in Thailand / S. Chutinimitkul, T. Chieochansin, S. Payungporn et al. // *Virus Res.* – 2008. – V. 132. – P. 121-131.
48. Chutinimitkul S. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding / S. Chutinimitkul, S. Herfst, J. Steel et al. // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – P. 11802-11813.
49. Clavijo A. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus/ A. Clavijo, D.B. Tresnan, R. Jolie, E.-M. Zhou // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. – V. 66. – P.117-121.
50. Cohen J. Pandemic influenza. Straight from the pig's mouth: swine research with swine influenzas / J. Cohen // *Science.* – 2009. – V.325. – P. 140-141.
51. Colman P.M. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase / P.M. Colman, J.N. Varghese, W.G. Laver // *Nature.* – 1983. – V. 303. – P. 41-44.
52. Cox N. J. Orthomyxoviruses: Influenza / N. J. Cox, Y. Kawaoka // In Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, ed. Mahy W. W. J., Collier L.- 1998.- V. 1.- P. 385-433.
53. Cox N. J. Global epidemiology of influenza: past and present / N. J. Cox, K. Subbarao // *Ann. Rev. Med.* – 2000. – V. 51. – P.407-421.
54. Delport W. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology / W. Delport, A. F Poon, S. D. Frost, S. L. K. Pond // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26, №. 19. – P. 2455-2457.

55. DuBois R. M. Acid stability of the hemagglutinin protein regulates H5N1 influenza virus pathogenicity / R. M. DuBois, H. Zaraket, M. Reddivari // *PLoS Path.* – 2011. – V. 7, №. 12. – P. e1002398.
56. Ehrhardt C. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses / C. Ehrhardt, T. Wolff, S. Pleschka // *Journal of virology.* – 2007. – T. 81. – №. 7. – C. 3058-3067.
57. Fanning T.G. 1917 avian influenza virus suggests that the 1918 pandemic virus did not acquire its hemagglutinin directly from birds / T.G. Fanning, R.D. Slemons, A.H. Reid et al. // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – P. 7860-7862.
58. Franco-Paredes C. H1N1 influenza pandemics: comparing the events of 2009 in Mexico with those of 1976 and 1918-1919 / C. Franco-Paredes, I. Hernandez-Ramos, C. Del Rio et al. // *Arch. Med. Res.* – 2009. – V. 40. – P. 669-672.
59. Furuse Y., Suzuki A., Oshitani H. Reassortment between swine influenza A viruses increased their adaptation to humans in pandemic H1N1/09 / Y. Furuse, A. Suzuki, H. Oshitani // *Infection, Genetics and Evolution.* – 2010. – V. 10. – P. 569-574.
60. Gambaryan A.S. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses / A.S. Gambaryan, J.S. Robertson, M.N. Matrosovich // *Virology.* – 1999. – V. 258. – P. 232-239.
61. Garten R. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans / R. Garten, T.C. Davis, C.A. Russell et al. // *Science.* – 2009. – V. 325. – P. 197-201.
62. Galluzzi L. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes / L. Galluzzi, S. A. Aaronson, J. Abrams et al. // *Cell Death & Differentiation.* – 2009. – V. 16, №. 8. – P. 1093-1107.
63. Gerlach R.L. Early host responses of seasonal and pandemic influenza A viruses in primary well-differentiated human lung epithelial cells / R.L. Gerlach, V.J. Camp, Y.K. Chu, C.B. Jonsson // *PLoS One.* – 2013. – V.8. – P. e78912.
64. Gerlach T. Characterization of the neuraminidase of the H1N1/09 pandemic influenza virus / T. Gerlach, L. Kühling, J. Uhendorff et al. // *Vaccine.* – 2012. – V. 30. – P. 7348-7352.

65. Ghedin E. Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity / E. Ghedin, A. Fitch, A. Boyne et al. // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – P. 8832-8841.
66. Ghedin E. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance / E. Ghedin, J. Laplante, J. DePasse // *J. Infect. Dis.* – 2011. – V. 203. – P. 168-174.
67. Gibbs J. S. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function / J. S. Gibbs, D. Malide, F. Hornung // *J. Virol.* – 2003. – V. 77, №. 13. – P. 7214-7224.
68. Girard M.P. The 2009 A(H1N1) influenza virus pandemic: a review / M.P. Girard, J.S. Tam, O.M. Assossou, M.P. Kieny // *Vaccine.* – 2010. – V. 28. – P. 4895-4902.
69. Glinsky G.V. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations / G.V. Glinsky // *Cell Cycle.* – 2010. – V. 9. – P. 958-970.
70. Gorman O.T. Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis / O.T. Gorman, W.J. Bean, R.G. Webster // *Microbiol. Immunol.* – 1992. – V. 176. – P. 75-97.
71. Guarner J. Comparison of the pathology caused by H1N1, H5N1 and H3N2 influenza viruses / J. Guarner, R. Falcon-Escobedo // *Arch. Med. Res.* – 2009. – P. 655-661.
72. Gulati U. Mismatched hemagglutinin and neuraminidase specificities in recent H3N2 influenza viruses / U. Gulati, W Wu, S. Gulati et al. // *Virology.* – 2005. – V. 339. – P. 12-20.
73. Guo Y. Human influenza A(H1N2) viruses isolated from China / Y. Guo, X. Xu, N.J. Cox // *J. Gen. Virol.* – 1992. – V. 73. – P. 383-388.
74. Haaheim L.R. Basic influenza Virology and immunology. / L.R. Haaheim, J.S. Oxford / P. 19-30– In *Pandemic Influenza*, 2nd ed. 2013 . CAB International. Ed. Van-Tam J., Sellwood C. 234 P.

- 75.Hale B.G. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein / B.G. Hale, J. Steel, R.A. Medina et al. // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – P. 6909-6922.
- 76.Hao W. Evidence of intra-segmental homologous recombination in influenza A virus / W. Hao // *Gene.* - 2011. - V. 481, # 2. - P. 57-64.
- 77.Hay A.J. Antigenic and genetic characterization of current influenza strains / A.J. Hay, V. Gregory, A.R. Douglas, Y.P. Lin. // *Eur. J. Epidemiol.* – 1994. – V. 10. – P. 465-466.
- 78.He C.Q. Homologous recombination as an evolutionary force in the avian influenza / C.Q. He, Z.X. Xie, G.Z. Han et al. // *Mol. Biol. Evol.* – 2009. – V.26. – P.177–187.
- 79.He C. Q. Homologous recombination evidence in human and swine A viruses / C. Q. He, G. Z. Han, D. Wang et al. // *Virology.* – 2008. – V. 380. – P. 12-20.
- 80.Hinshaw V. S. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses / V. S.Hinshaw, C. W. Olsen, N. Dybdahl-Sissoko, D. Evans // *J. Virol.* – 1994. – V. 68, №. 6. – P. 3667-3673.
- 81.Holmes E.C. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses / E.C. Holmes, E. Ghedin, J. Taylor et al. // *PLoS Biol.* – 2005. – V.3. – P. e300.
- 82.Hooper K.A. Mutant influenza virus that uses an N1 neuraminidase as the receptor-binding protein / K.A. Hooper, J.D. Bloom // *J. Virol.* – 2013. – V. 87. – P. 12531-12540.
- 83.Hope-Simpson R.E. A new concept of the epidemic process of influenza A virus / R.E. Hope-Simpson, D.A. Golubev // *Epidemiol. Infect.* – 1987. – V.99. – P. 50-54.
- 84.Ito T. Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influenza human influenza virus receptor specificity and variant selection / T. Ito, Y. Suzuki, A. Takada et al. // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – P. 3357-3362.

85. Jackman M.R., Shurety W., Ellis J.A. et al. Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in CaCo-2 cells by cytochalasin D / M.R. Jackman, W. Shurety, J.A. Ellis et al. // *J. Cell Sci.* – 1994. – V.107. – P. 2547-2556.
86. Jahangir A. Evaluation of human intestinal epithelial differentiated cells (CaCo-2) for replication, plaque formation and isolation of avian influenza viruses / A. Jahangir, S. Ruenphet, K. Hara et al. // *J. Virol. Methods.* – 2010. – V. 169. – P. 232-238.
87. Jimenez-Alberto A. Analysis of adaptation mutants in the hemagglutinin of the influenza A(H1N1)pdm09 virus / A. Jimenez-Alberto, E. Alvarado-Facundo, R.M. Ribas-Aparcio, J.A. Castelan-Vega // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – P. e70005.
88. Katoh K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability / K. Katoh, D. M. Standley // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30. – P. 772-780.
89. Kawaoka Y. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics / Y. Kawaoka, S. Krauss, R. G. Webster // *Journal of virology.* – 1989. – V. 63, №. 11. – P. 4603-4608.
90. Keenslide J. Pandemic influenza A H1N1 in swine and other animals / J. Keenslide // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. – V. 370. – P. 259-271.
91. Kendal A.P. Antigenic similarity of influenza A(H1N1) viruses from epidemics in 1977-1978 to “Scandinavian” strains isolated in epidemics of 1950-1951 / A.P. Kendal, G.R. Noble, J.J. Shekel, W.R. Dowdle // *Virology.* – 1978. – V. 89. – P.632-636.
92. Kilander A. Observed association between the HA1 mutation D222G in 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway, 2009-2010 / A. Kilander, R. Rykkvin, S.G. Dudman, O. Hungnes // *Euro Surveill.* – 2010. – V.15. – P.16-27.
93. Kilbourne E.D. Influenza pandemics in 20th century / E.D. Kilbourne // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – V. 12. – P. 9-14.
94. Influenza pandemics in perspective / E.D. Kilbourne // *JAMA.* – 1977. – V. 237. – P.1225-1228.

95. Kilbourne E.D. The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic / E.D. Kilbourne, C. Smith, I. Brett et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – V. 99. – P. 10748-10752.
96. Kiseleva I. Phenotypic characteristics of novel swine-origin influenza A/California/07/09 (H1N1) virus / I. Kiseleva, N. Larionova, V. Kuznetsov, L. Rudenko // *Influenza and other Respiratory Diseases.* – 2009. – V. 4. – P.1-5.
97. Kobasa D. Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase / D. Kobasa, S. Kodihalli, M. Luo // *J. Virol.* – 1999. – V. 73. – P. 6743-6751.
98. Koelle K. Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpanemics influenza A(H3N2) in humans / K. Koelle, S. Cobey, B. Grenfell, M. Pascual // *Science.* – 2006. – V. 314. – P. 1898-1903.
99. Koen J.S. A practical method for field diagnoses of swine diseases / J.S. Koen // *Am. J. Vet. Med.* – 1919. – P. 468-470.
100. Kosakovsky Pond S. L. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments / S. L. Kosakovsky Pond, S. D. W. Frost // *Bioinformatics.* – 2005. – V. 21, №. 10. – P. 2531-2533.
101. Krueger W.S. Swine influenza virus infections in man / W.S. Krueger, G.C. Gray // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. – V. 370. – P. 201-225.
102. Krumbholz A. Current knowledge on the PB1-f2 of influenza A viruses / A. Krumbholz, A. Philipps, H. Oehring et al. // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2011. – V. 200. – P. 69-75.
103. Kuiken T. Public Health. Pathogen surveillance in animals / T. Kuiken, F.A. Leighton, R.A. Fouchier et al. // *Science.* – 2005. – V. 309. – P. 1680-1681.
104. Kumlin U. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism / U. Kumlin, S. Olofsson, K. Dimock, N. Arnberg // *Influenza and other respiratory diseases.* – 2008. – V. 2. – P. 147-154.

105. Kwon D. Replication and pathogenesis of the pandemic (H1N1)2009 influenza virus in mammalian models / D. Kwon, K. Shin, S. Kim et al. // *J. Microbiol.* – 2010. – V. 48. – P. 657-662.
106. Larkin M. A. Clustal W and Clustal X version 2.0 / M.A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown et al. // *Bioinformatics.* – 2007. – V. 23. – P. 2947-2948.
107. Lee N. Co-infection with pandemic H1N1 and seasonal H3N2 influenza viruses / N. Lee, P. Chan, W. Lam et al. // *Ann. Intern. Med.* – 2010. – V. 152. – P. 618-619.
108. Lemaitre M. Comparative age distribution of influenza morbidity and mortality during seasonal influenza epidemics and the 2009 H1N1 pandemic / M. Lemaitre, F. Carrat // *BMC infectious diseases.* – 2010. – V. 10. – P. 162.
109. Li I.W.S. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1 and avian influenza A H5N1 viruses / I.W.S. Li, K.H. Chan, K.W.K. To et al. // *J. Clin. Virol.* – 2009. – V. 46. – P. 325-330.
110. Li W. Effects of NS1 variants of H5N1 influenza virus on interferon induction, TNF alpha response and p53 activity / W. Li, G. Wang, H. Zhang et al. // *Cell. Mol. Immunol.* – 2010. – V. 7, №. 3. – P. 235-242.
111. Li W. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses / W. Li, W. Shi, H. Qiao et al. // *Virology J.* – 2011. – V. 8. – P. 183.
112. Lin Y.P. Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? / Y.P. Lin, V. Gregory, P. Collins et al. // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – P. 6769-6778.
113. Lindstrom S. Phylogenetic analysis of the entire genome of influenza A(H3N2) viruses from Japan: evidence for genetic reassortment of the six internal genes / S. Lindstrom, S. Sugita, A. Endo // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – P. 8021-8031.

114. Lipatov A. Domestic pigs have low susceptibility to H5N1 HPAI viruses / A. Lipatov, Y.K. Kwon, L.V. Sarmiento et al. // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4, # 7. – P. e1000102.
115. Lombardo T. Susceptibility of different cell lines to avian and swine influenza viruses / T. Lombardo, S. Dotti, S. Renzi, M. Ferrari // *J. Virol. Methods.* – 2012. – V. 185, №. 1. – P. 82-88.
116. Lowen A.C. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses / A.C. Lowen, S. Mubareka, T.M. Tumpey et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2006. – V. 103. – P. 9988-9992.
117. Ludwig S. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? / S. Ludwig, L. Stilz, O. Planz // *Virology.* – 1995. – V. 212. – P. 555-561.
118. Ludwig S. Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells / S. Ludwig, S. Pleschka, O. Planz, T. Wolff // *Cellular microbiology.* – 2006. – V. 8. – №. 3. – P. 375-386.
119. Ma W. North american triple reassortant and Eurasian H1N1 swine influenza viruses do not readily reassort to generate a 2009 pandemic H1N1-like virus / W. Ma, Q. Liu, C. Qiao et al. // *mBio.* – 2014. – V. 5. – P. e00919-13.
120. Ma W. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications / W. Ma, R.E. Kahn, J. Richt // *J. Mol. Gen. Med.* – 2009. – V. 3. – P. 158-166.
121. Mahardika I.G.N. Isolation of avian influenza H5N1 virus from sick pigs in Bali in 2006 / I.G.N. Mahardika // *J. Gen. Virol.* – 2008. – V. 89. – P. 734-743.
122. Maines T. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice / T. Maines, A. Jayaraman, J. Belser et al. // *Science.* – 2009. – V. 325. – P. 484-487.
123. Massin P. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses / P. Massin, S. van der Werf, N. Naffakh // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – P. 5398-5404.

124. Matrosovich M. Overexpression of the α -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors / M. Matrosovich, J. Matrosovich, N.A. Carr et al. // *J. Virol.* – 2003. – V. 77. – P. 8418-8425.
125. Matrosovich M. Influenza receptors, polymerase and host range / M. Matrosovich, J. Stech, H.D. Klenk // *Rev. Sci. Tech.* – 2009. – V. 28. – P. 203-217.
126. Matrosovich M.N. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site / M.N. Matrosovich, A.S. Gambaryan, S. Teneberg et al. // *Virology.* – 1997. – V. 223. – P. 224-234.
127. McAuley J. L. The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis / J. L. McAuley, K. Zhang, J. A. McCullers // *Journal of virology.* – 2010. – T. 84. – №. 1. – C. 558-564.
128. McKimm-Breschkin J.L. Generation and characterization of variants of NWS/G70C influenza virus after in vitro passage in 4-amino-Neu5Ac2en and 4-guanidino-Neu5Ac2en / J.L. McKimm-Breschkin, T.J. Blick, A. Sahasrabudhe et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1996. – V. 40. – P. 40-46.
129. McMenamin J. Epidemiology of pandemic influenza A(H1N1)pdm09. / J. McMenamin, J. Van-Tam – In: *Pandemic Influenza*, 2nd ed. / Ed. Van-Tam J., Sellwood C. – CAB International, 2013. – 234 P.
130. Melidou A. Molecular and phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene of pandemic influenza H1N1 2009 viruses associated with severe and fatal infections / A. Melidou, G. Gioula, M. Exindari et al. // *Virus Res.* – 2010. – V. 151. – P. 192-199.
131. Mochalova L. Oligosaccharide specificity of influenza H1N1 virus neuraminidases / L. Mochalova, V. Kurova, Y. Shtyrya // *Arch. Virol.* – 2007. – V. 152. – P. 2047-2057.
132. Monto A.S. The threat of an avian influenza pandemic / A.S. Monto // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – V. 352. – P. 323-325.

133. Monto A.S. History and epidemiological features of pandemic influenza. / A.S. Monto, C. Sellwood – In: *Pandemic Influenza*, 2nd ed. / Ed. Van-Tam J., Sellwood C. – CAB International, 2013. – 234 P.
134. Morens D.M. Pandemic influenza: certain uncertainties / D.M. Morens, J.K. Taubenberger // *Rev. Med. Virol.* – 2011. – V. 21. P. 262-284.
135. Morens D.M. The persistent legacy of the 1918 influenza virus / D.M. Morens, J.K. Taubenberger, A.S. Fauci // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – V. 361. – P. 225-229.
136. Morris S. J. Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis / S. J. Morris, G. E. Price, J. M. Barnett et al. // *J. Gen. Virol.* – 1999. – V. 80, №. 1. – P. 137-146.
137. Morris S. J. Influenza A virus-induced apoptosis is a multifactorial process: exploiting reverse genetics to elucidate the role of influenza A virus proteins in virus-induced apoptosis / S. J. Morris, K. Nightingale, H. Smith, C. Sweet // *Virology.* – 2005. – V. 335, №. 2. – P. 198-211.
138. Mohsin M. A. Correlation between levels of apoptosis, levels of infection and haemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have a role in these associations / M.A. Mohsin, S. J. Morris, H. Smith, C. Sweet // *Virus Res.* – 2002. – V. 85, №. 2. – P. 123-131.
139. Munier S. A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of neuraminidase has increased virulence for chickens / S. Munier, T. Larcher, F. Cormier-Aline et al. // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – P. 940-952.
140. Muster V. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets / V. Muster, E. de Wit, J. van-den-Brand et al. // *Science.* – 2009. – V. 325. – P. 481-483.
141. Myles P.R. Predictors of clinical outcome in a national hospitalized cohort across both waves of the influenza A/H1N1 pandemic 2009-2010 in the UK / P.R. Myles, M.G. Semple, W.S. Lim et al. // *Thorax.* – 2012. – V. 67. – P. 709-717.
142. Mytton O.T. Influenza A(H1N1)pdm09 in England, 2009-2011: a greater burden of severe illness in the year after the pandemic than in the pandemic year/

- O.T. Mytton, P.D. Rutter, L.J. Donaldson // *Eurosurveill.* – 2012. – V. 12. – P. 51-60.
143. Nakajima M.S. Identification of the binding sites to monoclonal antibodies on A/USSR/90/77 (H1N1) hemagglutinin and their involvement in antigenic drift in H1N1 influenza virus / M.S. Nakajima, K. Nakajima, A.P. Kendal // *Virology.* – 1983. – V. 131. – P. 116-127.
144. Nardelli L. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976 / L. Nardelli, S. Pascucci, G.L. Gualandi, P. Loda // *Zentralbl. Veterinarmed.* – 1978. – V. 25. – P. 853-857.
145. Nelson M.I. The evolution of epidemic influenza / M.I. Nelson, E.C. Holmes // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – V.8. – P. 196-205.
146. Nelson M.I. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918 / M.I. Nelson, C. Viboud, L. Simonsen et al. // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4. – P. e1000012.
147. Neumann G. The first influenza pandemic of the new millennium / G. Neumann, Y. Kawaoka // *Influenza and other respiratory viruses.* – 2011. – V. 5, №. 3. – P. 157-166.
148. Oh D.Y. MDCK-Siat1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells / D.Y. Oh, I.G. Barr, J.A. Mosse et al. // *J. Clin. Virol.* – 2008. – V.46. – P. 2189-2194.
149. Olsen B. Global patterns of influenza A virus in wild birds / B. Olsen, V.J. Munster, A. Wallensten et al. // *Science.* – 2006. – V. 312. – P. 384 – 388.
150. Orlich M. Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza A virus / M. Orlich, H. Gottwald, R. Rott // *Virology.* – 1994. – V. 204. – P. 462-465.
151. Palese P. Why do influenza viruses die out? A Hypothesis / P. Palese, T.T. Wang // *mBio.* – 2011. – V.2, #5. – P. e00150-11.
152. Perez D. R. Fitness of pandemic H1N1 and seasonal influenza A viruses during co-infection: evidence of competitive advantage of pandemic H1N1

- influenza versus seasonal influenza / D. R. Perez, E. Sorrell, M. Angel, et al. // PLoS currents. – 2009. – V. 1.
153. Pica N. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses / N. Pica, K. Hai, T.T. Wang et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2012. – V. 109, #7. – P. 2573-2578.
154. Pinto M. Enteroocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture / M. Pinto, S. Robin-Leon, M.T. Appay et al. // Biol. Cell. – 1983. – V.7. – P. 323-330.
155. Price G. E. Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence / G. E. Price, H. Smith, C. Sweet // J. Gen. Virol. – 1997. – V. 78, №. 11. – P. 2821-2829.
156. Quiliano M. Molecular distribution of amino acids substitutions on neuraminidase from 2009 (H1N1) human influenza pandemic virus / M. Quiliano, H. Valdivia-Olarte, C. Olivares et al. // Bioinformation. – 2013. – V. 9. – P. 673-679.
157. Ramos I. Contribution of double-stranded RNA and CPSF30 binding domains of influenza virus NS1 to the inhibition of type I interferon production and activation of human dendritic cells / I. Ramos, E. Carnero, D. Bernal-Rubio et al. // J. Virol. – 2013. – V. 87. – P. 2430-2440.
158. Reed L. J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L. J. Reed, H. Muench // American journal of epidemiology. – 1938. – V. 27, №. 3. – P. 493-497.
159. Reid A.H. Origin and evolution of the 1918 ‘Spanish’ influenza virus hemagglutinin gene / A.H. Reid, T.G. Fanning, J.V. Hultin, J.K. Taubenberger // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1999. – V. 96. – P. 1651-1656.
160. Reid A.H. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma / A.H. Reid, J.K. Taubenberger // J. Gen. Virol. – 2003. – V. 84. – P. 2285-2292.

161. Reperant L.A. Influenza in Birds and Mammals / L.A. Reperant, D.M.E. Osterhaus // – In *Pandemic Influenza*, 2nd ed; CAB International, 2013. Ed. Van-Tam J., Sellwood C. – 234 P.
162. Riley S. Epidemiological characteristics of 2009 (H1N1) pandemic influenza based on paired sera from a longitudinal community cohort study / S. Riley, K.O. Kwok, K.M. Wu et al. // *PLoS Medicine*. – 2011. – V. 8. – P. e1000442.
163. Robertson J.S. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus / J.S. Robertson, J.S. Bootman., R. Newman et al. // *Virology*. – 1987. – V. 160. – P. 31-37.
164. Roedig J. V. Impact of different influenza cultivation conditions on HA N-Glycosylation / J. V. Roedig, E. Rapp, Y. Genzel, U. Reichl // *BMC proceedings*. – 2011. – V. 5, №. Suppl 8. – P. P113.
165. Rogers G.N. Receptor-binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates / G.N. Rogers, B.L. DeSouza // *Virology*. – 1989. – V. 173. – P. 317-322.
166. Russell R.J. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design / R.J. Russell, L.F. Haire, D.J. Stevens et al. // *Nature*. – 2006. – V. 443. – P. 45-49.
167. Scholtissek C. Molecular evolution of influenza viruses / C. Scholtissek // *Virus Genes*. – 1996. – V. 11. – P. 209-215.
168. Scholtissek C. Pigs as a “mixing vessel” for the creation of new pandemic influenza A viruses / C. Scholtissek // *Med. Princip. Prac.* – 1990. – V. 2. – P. 65-71.
169. Scholtissek C. Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1947 and 1957 (H1N1) / C. Scholtissek, V. von Hoyningen, R. Rott // *Virology*. – 1978. – V. 89. – P. 613-617.

170. Schultz-Cherry S. Influenza virus NS1 induces apoptosis in cultured cells / S. Schultz-Cherry, N. Dibdahl-Sissoko, G. Neumann et al. // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – P. 7875-7881.
171. Schultz-Cherry S. Mink lung epithelial cells: unique cell line that supports influenza A and B replication / S. Schultz-Cherry, N. Dybdahl-Sissoko, M. McGregor, V.S. Hinshaw // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – V. 36. – P. 3718-3720.
172. Schultz-Cherry S. History of swine influenza / S. Schultz-Cherry, C.W. Olsen, B.C. Easterday // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2011. – V. 370. – P. 21-27.
173. Schultze I.T. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin / I.T. Schultze // *J. Infect. Dis.* – 1997. – V. 176. – P. S24-28.
174. Seo S.H. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies / S.H. Seo, O. Goloubeva, R. Webby et al. // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – P. 9517-9525.
175. Shen J. Evolutionary trends of A(H1N1) influenza virus hemagglutinin since 1918 / J. Shen, J. Ma, Q. Wang // *PLoS One.* – 2009. – V. 4. – P. e7789.
176. Shope R. Swine influenza: experimental transmission and pathology / R. Shope, P. Lewis // *J. Exp. Med.* – 1931. – V. 54. – P. 349-359.
177. Shope R.E. The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages / R.E. Shope // *J. Exp. Med.* – 1936. – V. 63. – P. 669-684.
178. Shtyrya Y.A. Influenza virus neuraminidase: Structure and function / Y.A. Shtyrya, L.V. Mochalova, N.V. Bovin // *Acta Naturae.* – 2009. – V. 1. – P. 26-32.
179. Smith D.J. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus / D.J. Smith, A.S. Lapedes, J.C. de Jong et al. // *Science.* – 2004. – V. 305. – P. 371-376.

180. Smith G.J. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic / G.J. Smith, D. Vijaykrishna, J. Bahl et al. // *Nature*. – 2009. – V. 459. – P. 1122-1125.
181. Srinivasan A. Quantative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses / A. Srinivasan, K. Viswanathan, R. Raman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – V. 105. – P. 2800-2805.
182. Stevens J. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities / J. Stevens, O. Blixt, L. Glaser et al. // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 355. – P. 1143-1155.
183. Stray S.J. Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin / S.J. Stray, L.B. Pittmann // *Virol. J.* – 2012. – V. 9. – P. 91-109.
184. Sullivan S.J. 2009 H1N1 influenza / S.J. Sullivan, R.M. Jacobson, W.R. Dowdle, G.A. Poland // *Mayo Clin. Proc.* – 2010. – V. 85. – P. 64-76.
185. Suzuki Y. et al. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses / Y. Suzuki, T. Ito, T. Suzuki et al. // *J. Virol.* – 2000. – V. 74, №. 24. – P. 11825-11831.
186. Takano R. A comparison of the pathogenicity of avian and swine H5N1 influenza viruses in Indonesia / R. Takano, C.A. Nidom, M. Kiso et al. // *Arch. Virol.* – 2009. – V. 154. – P. 677-681.
187. Tamura K. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30. – P. 2725-2729.
188. Taubenberger J. The pathology of influenza virus infections / J. Taubenberger, D. Morens // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2008. – V.3. – P. 499-522.
189. Taubenberger J.K. 1918 influenza: the mother of all pandemics / J. Taubenberger, D. Morens // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – V. 12. – P. 15-22.

190. Taubenberger J.K. Integrating historical, clinical and molecular data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus / J.K. Taubenberger, A.H. Reid, T.A. Janczewski, T.G. Fanning // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* – 2001. – V. 356. – P. 1829-1839.
191. Tong S. New world bats harbor diverse influenza A viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al. // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. – P. e1003657.
192. Toshihiro J. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential / J. Toshihiro, J. Nelson, S.S. Couceiro et al. // *J. Virol.* 1998. – V. 72. – P. 7367-7373.
193. Tse H. Structural basis and sequence co-evolution analysis of the hemagglutinin protein of pandemic influenza A/H1N1 (2009) virus / H. Tse, R.Y.T. Kao, W.L. Wu et al. // *Exp. Biol. Med.* – 2011. – V. 236. – P. 915-925.
194. Tumpey T.M. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission / T.M. Tumpey, T.R. Maines, N. van Hoeven et al. // *Science.* – 2007. – V. 315. – P. 655-659.
195. Ueda M. Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus / M. Ueda, M. Yamate, A. Du et al. // *Virus Res.* – 2008. – V. 136. – P. 91-97.
196. Van Poucke S.G.M. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution / S.G.M. van Poucke S.G.M., J.M. Nicholls, H.J. Nauwynck, K.V. van Reeth // *Virology J.* – 2010. – V.7. – P. 38.
197. Viboud C. 1951 Influenza epidemic, England and Wales, Canada and the United States / C. Viboud, T. Tam, D. Fleming, M. Miller, L. Simonsen // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – V. 12. – P. 661-668.
198. Wagner R. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections / R. Wagner, M. Matrosovich, H.-D. Klenk // *Rev. Med. Virol.* – 2002. – V. 12. – P. 159-166.

199. Webby R. J. Are we ready for pandemic influenza? / R. J. Webby, R. G. Webster // *Science*. – 2003. – V. 302. – P. 1519-1522.
200. Webster R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster, W.J. Bean, O.T. Gorman et al. // *Microbiol. Rev.* – 1992. – V. 56. – P. 152-179.
201. Webster R.G. Protection against lethal influenza with neuraminidase / R.G. Webster, P.A. Reay, W.G. Laver // *Virology*. – 1988. – V. 164. – P. 230-237.
202. Wedde M. Predominance of HA-222D/G polymorphism in influenza A(H1N1)pdm09 viruses associated with fatal and severe outcomes recently circulating in Germany / M. Wedde, S. Wählisch, T. Wolff, B. Schweiger // *PLoS One*. – 2013. – V.8. – P. e57059.
203. Weingartl H.M. Experimental infection of pigs with human 1918 pandemic influenza virus / H.M. Weingartl, R.A. Albrecht, K.M. Lager et al. // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – P. 4287-4296.
204. Widjaja L. Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs / L. Widjaja, N. Ilyushina, R.G. Webster, R.J. Webby // *Virology*. – V. 350. – P. 137-145.
205. Wilson I.A. Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza at 3Å resolution / I.A. Wilson, J.J. Shekel, D.S. Wiley // *Nature*. – 1981. – V. 289. – P. 366-373.
206. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. – 2002. – [электронный ресурс] URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_NCS_2002.5.pdf (дата обращения 20.02.2014)
207. WHO Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. – 2011. – WHO. – 139 p. [электронный ресурс] URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf (дата обращения 20.06.2014)
208. World Health Organization Influenza Centre. NIMR annual report 2009. http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_sep_2009.pdf [электронный ресурс] (дата обращения 12.12.2013).

209. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2010. [электронный ресурс] URL: http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2010.pdf (дата обращения 14.12.2013).
210. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report September 2010. [электронный ресурс] URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-sep-2010.pdf> (дата обращения 14.12.2013)
211. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2011. [электронный ресурс] URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2011.pdf> (дата обращения 16.12.2013).
212. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report September 2011. [электронный ресурс] URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-sep-2011.pdf> (дата обращения 20.12.2013).
213. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2012. [электронный ресурс] URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2012.pdf> (дата обращения 24.12.2013).
214. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report September 2012. [электронный ресурс] URL: http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/Interim_Report_September_2012_2.pdf (дата обращения 22.12.2013).
215. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2013. [электронный ресурс] URL: http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/Interim_Report_February_2013.pdf (дата обращения 09.02.2014).

216. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report September 2013. [электронный ресурс]
URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Sep2013final.pdf> (дата обращения 03.03.2014).
217. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2014. [электронный ресурс]
URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Feb2014-web.pdf> (дата обращения 05.03.2014).
218. World Health Organization. Statement by WHO Director-general, Dr. Margaret Chan 11 June 2009b. World now at the start of 2009 influenza pandemic. [электронный ресурс]
URL:
http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html. (дата обращения 20.05.2014).
219. World Health Organization. Statement by WHO Director-general, Dr. Margaret Chan 10 August 2010b. H1N1 in post-pandemic period.
[электронный ресурс] URL:
http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/
(дата обращения 20.05.2014).
220. Worobey M. Genesis and pathogenesis of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus / M. Worobey, G.-Z. Han, A. Rambaut // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2014. – V. 111, №. 22. – P. 8107-8112.
221. Worobey M. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses / M. Worobei, E.C. Holmes // *J. Gen. Virol.* – 1999. – V. 80. – P. 2535-2543.
222. Wurzer W.J. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation / W.J. Wurzer, O. Planz, C. Ehrhardt et al. // *EMBO J.* –2003. – V. 22. – P. 2717-2728.
223. Xu L. A single-amino-acid substitution in the HA protein changes the replication and pathogenicity of the 2009 pandemic A(H1N1) influenza viruses in

- vitro and in vivo / L. Xu, L. Bao, Q. Lv et al. // *Virology J.* – 2010. – V. 7. – P. 325.
224. Xu X. Genetic and antigenic analyses of influenza A(H1N1) viruses, 1986-1991 / X. Xu, E.P. Rocha, H.L. Regenery et al. // *Virus Res.* – 1993. – V. 28. – P. 37-55.
225. Yang H. Structure and receptor-binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin / H. Yang, P. Carney, J. Stevens // *PLoS Curr.* – 2010. – V.2. - doi: 10.1371/currents RRN1152.
226. Yang H. Structural stability of influenza A(H1N1)pdm09 virus hemagglutinins / H. Yang, J.C. Chang, Z. Guo et al // *J. Virol.* – 2014. – V. 88. – P. 4828-4838.
227. Yang N. The 2009 pandemic A/Wenshan/01/09 H1N1 induces apoptotic cell death in human airway epithelial cells A549 / N. Yang, X. Hong, P. Yang et al. // *J. Mol. Cell. Biol.* – 2011. – V.3. – P. 221-229.
228. Yasugi M. Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan between 2009 and 2010 / M. Yasugi, S. Nakamura, T. Daidoji et al. // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – P. e30946.
229. York I. The 2009 pandemic influenza virus: where did it come from, where is it now and where is it going? / I. York, R.O. Donis // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. – V. 370. – P. 241-257.
230. Yoshino S. Use of CaCo-2 cells for isolation of influenza virus / S. Yoshino, S. Yamamoto, N. Kawabata // *Kansenshogaku Zasshi.* – 1998. – V. 72. – P. 347-351.
231. Zamarin D. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1 / D. Zamarin, A. Garcia-Sastre, X. Xiao et al.// *PLoS Pathogens.* –2005. –V1. – P. e4.
232. Zhirnov O. Human influenza A viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CaCo-2 cells / O. Zhirnov, H.D. Klenk // *Virology.* – 2003. – V. 313. – P. 198-212.

233. Zhu H. History of swine influenza in Asia / H. Zhu, R. Webby, T.T.Y. Lam et al. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. – V. 370. – P. 57-68.
234. Zimmer S.M. Historical perspective – emergence of influenza A(H1N1) viruses / S.M. Zimmer, D.S. Burke // *N. Eng. J. Med.* – 2009. – V. 361, N.3. – P. 279-285.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Перечень таблиц, приведенных в работе:

- Таблица 2.1. Вирусы гриппа птиц А(Н5N1), использованные в работе, стр. 67.
- Таблица 2.2. Клеточные линии человека из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа, стр. 69.
- Таблица. 2.3. Праймеры для секвенирования фрагментов генома вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, стр. 77
- Таблица 3.1. Эффективность выделения вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 на культуре клеток СаСо-2, стр. 85.
- Таблица 3.2. Инфекционная активность вирусов гриппа птиц А(Н5N1) в культуре клеток MDCK, стр. 89.
- Таблица 3.3. Инфекционная активность вирусов гриппа человека и свиньи в культуре клеток MDCK (1g ТЦИД₅₀/мл), стр. 90.
- Таблица 3.4. Чувствительность клеточных линий человека и животных к вирусам гриппа А различного происхождения, стр. 93.
- Таблица 3.5. Чувствительность клеточных линий человека и животных к вирусам гриппа А различного происхождения (метод ИФА), стр. 94.
- Таблица 3.6. Интенсивность флуоресценции красителей, использованных для выявления апоптоза в культурах клеток, стр. 100.
- Таблица 3.7. Активность нейраминидазы вирусов гриппа птиц, свиней и человека различных подтипов в тесте MUNANA, стр. 103.
- Таблица 3.8. Сравнительные данные по РТГА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с крысиными и хорьковыми антисыворотками, обратные гомологичные титры антисывороток, стр. 108.
- Таблица 3.9. Сравнительные данные по РТГА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с крысиными и хорьковыми антисыворотками, стр. 109.
- Таблица 3.10. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг, стр. 112.

Таблица 3.11. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг., стр. 114.

Таблица 3.12. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2010-2011 гг., стр. 116.

Таблица 3.13. Антигенная структура вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2012-2013 гг., стр. 118.

Таблица 3.14. Антигенный анализ вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 с использованием поликлональных крысиных антисывороток, полученных к эмбриональным (КЭ) и клеточным (МДСК) вариантам вирусов, стр. 121.

Таблица 3.15. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг., стр. 127.

Таблица 3.16. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2010-2011 гг., стр. 130.

Таблица 3.17. Генетические группы вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 по данным сотрудничающего центра ВОЗ в Лондоне на 2012-2013 гг., стр. 132.

Таблица 3.18. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2010-2011 гг., стр. 134.

Таблица 3.19. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, в сравнении с эталонными вирусами «классического гриппа» свиней и родственными им вирусами гриппа человека, стр. 136.

Таблица 3.20. Сайты в НА, находящиеся под действием позитивной селекции, стр. 143.

Таблица 3.21. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2009-2010 гг, стр. 147.

Таблица 3.22. Аминокислотные замены в молекуле НА вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2010-2011 гг., стр. 149.

Таблица 3.23. Аминокислотные замены в молекуле NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных в России в эпидемический сезон 2012-2013 гг., стр. 151.

Таблица 3.24. Аминокислотные замены в NA вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, в сравнении с эталонными вирусами «классического гриппа» свиней и родственными им вирусами гриппа человека, стр. 152.

Таблица 3.25. Сайты в NA, находящиеся под действием позитивной селекции, стр. 155.

Перечень рисунков, приведенных в работе:

Рисунок 1.1. Временная шкала с нанесенными пандемическими событиями и этиологическими агентами пандемий, стр. 16

Рисунок 1.2. Происхождение геномных сегментов вирусов пандемического гриппа, стр. 19

Рисунок 1.3. Механизмы формирования пандемических вирусов гриппа А согласно зоонозной концепции, стр. 24

Рисунок 1.4. Пандемические волны (первая и вторая) в Великобритании в период 2009-2010 гг., стр. 29.

Рисунок 1.5. Структура рецептор-связывающего сайта вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, стр. 33.

Рисунок 1.6. Происхождение вирусов 1918г, вирусов гриппа свиней и вирусов сезонного гриппа 1922-1957 г., 47.

Рисунок 1.7. Схематическая репрезентация филогенетических паттернов восьми сегментов генома вирусов гриппа A(H1N1), циркулировавших с 1918 по 2006 гг., стр. 51.

Рисунок 1.8. Антигенные сайты в молекуле гемагглютинаина вируса гриппа А/Пуэрто Рико/8/34, стр. 53.

Рисунок 1.9. Основные генетические группы вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 по данным СЦ ВОЗ по гриппу, стр. 57.

Рисунок 1.10. Аминокислотные остатки образующие активный сайт NA в комплексе с субстратом 2-дезоксидезокси-2,3-дегидро-N-ацетилнейраминовой кислотой, стр. 62.

Рисунок 3.1. Структура популяции вирусов гриппа, выделенных в России за пятилетний период с 2009 по 2013 гг., стр. 79.

Рисунок 3.2. Количество штаммов вирусов гриппа А и В, выделенных в РФ за период 2009-2013 гг. по данным ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, стр. 80.

Рисунок 3.3. Выделение вирусов гриппа в сезоны 2009-2013 гг. на культуре клеток MDCK и куриных эмбрионах, стр. 82.

Рисунок 3.4. Сравнительная характеристика титров ГА вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, выделенных в 2009-2013 гг на КЭ и культуре клеток MDCK, стр. 83.

Рисунок 3.5. Титры вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 при выделении на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1, стр. 86.

Рисунок 3.6. Морфологические изменения в ядрах клеток, окрашенных Hoechst-33258 при вирус-индуцированный апоптозе в культурах клеток человека. Увеличение 450 (иммерсия), стр. 96.

Рисунок 3.7. Апоптоз в клеточной линии карциномы легкого человека А-549, индуцированный вирусами гриппа различного происхождения (МИ=0,1) через 20 ч после заражения, стр. 97.

Рисунок 3.8. Активность нейраминидазы в тесте MUNANA вирусов гриппа свиней, стр. 104.

Рисунок 3.9. Активность нейраминидазы в тесте MUNANA вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 разных лет выделения, стр. 105.

Рисунок 3.10. Антигенная карта для вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг., стр. 123.

Рисунок 3.11. Антигенная карта для вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, выделенных в России в период с 2009 по 2013 гг. с добавлением антигенов и антисывороток, родственных «классическому» гриппу свиней А(H1N1), стр. 125.

Рисунок 3.12. Основные аминокислотные отличия вирусов «классического» гриппа свиней и родственных им по НА вирусов гриппа человека от современных вирусов A(H1N1)pdm09, стр. 138.

Рисунок 3.13. Сводные данные о частоте встречаемости замены в 222 положении молекулы НА1 у вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, секвенированных из мазков и аутопсийного материала, собранных в России в период с 2009 по 2013 гг. (по данным базы GenBank), стр. 140.

Рисунок 3.14. Филогенетическое дерево по гену НА, построенное методом максимального правдоподобия, стр. 146.

Рисунок 3.15. Основные аминокислотные отличия вирусов «классического» гриппа свиней и родственных им по НА вирусов гриппа человека от современных вирусов A(H1N1)pdm09, стр. 154.

Рисунок 3.16. Филогенетическое дерево по гену НА, построенное методом максимального правдоподобия (приведены группы соответствия по НА), стр. 156.

Рисунок 4.1. Предсказанные аминокислотные последовательности участка молекулы НА в районе сайта протеолитического расщепления для вирусов гриппа A(H5N1), стр. 164.

Рисунок. 4.2. Предсказанные аминокислотные последовательности белка PB1-f2 вирусов гриппа А, использованных в работе, стр. 168.

Рисунок. 4.3. Предсказанные аминокислотные последовательности белка NS1 вирусов гриппа А, использованных в работе, стр. 169.

Рисунок 4.4. Пути образования современных вирусов гриппа человека и свиней, стр. 180.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Таблицы антигенного анализа вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 2009-2013 гг. выделения

Вирусы гриппа	Крысиные поликлональные антисыворотки к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09						
	А/Калифорния/ 7/2009	А/С.- Петербург / 56/2009	А/Ю.Каролина/ 20/2010	А/Львов/ 6/2009	А/Гонконг/ 2121/10	А/Крайстчерч/ 16/ 2010	А/С.- Петер бург/ 27/11
А/Калифорния/ 7/2009	640	320	640	160	160	160	320
А/С.-Петербург/ 56/2009	640	640	640	160	160	160	160
А/Ю.Каролина/ 20/2010	640	640	1280	320	320	320	320
А/Львов/ 6/2009	160	160	320	640	320	320	80
А/Гонконг/ 2121/10	320	320	640	160	640	320	80
А/Крайстчерч/ 16/ 2010	640	320	640	160	320	1280	160
А/С.-Петербург/ 27/11	640	640	1280	80	160	320	320
А/С.-Петербург/ 1/2013	640	320	1280	160	160	160	320
А/С.-Петербург/ 3/2013	320	320	640	80	80	160	160
А/С.-Петербург/ 5/2013	320	320	640	160	160	160	320

A/C.- Петербург/21/2013	1280	640	1280	320	320	320	320
A/C.- Петербург/135/2013	160	320	320	80	80	160	80
A/C.- Петербург/3/2013	320	320	640	80	80	160	160
A/C.- Петербург/8/2013	640	640	1280	320	320	320	320
A/C.- Петербург/16/2013	320	640	640	160	160	320	320
A/C.- Петербург/26/2013	640	640	1280	160	320	320	320
A/C.- Петербург/28/2013	320	320	640	160	160	160	160
A/C.- Петербург/46/2013	320	320	1280	160	160	160	160
A/C.- Петербург/54/2013	320	320	320	80	80	160	80
A/Saint- Petersburg/55/2013	640	640	640	160	80	320	160
A/C.- Петербург/66/2013	320	320	640	80	80	320	80
A/C.- Петербург/70/2013	640	640	1280	80	80	640	160
A/C.- Петербург/133/2013	640	640	640	80	160	320	160
A/C.- Петербург/134/2013	640	320	640	80	160	320	160

А/С.- Петербург/135/2013	320	320	320	80	160	160	160
А/С.- Петербург/136/2013	320	320	640	80	160	160	80
А/С.- Петербург/141/2013	320	320	640	80	80	320	160
А/С.- Петербург/142/2013	320	320	320	80	80	320	160
А/С.- Петербург/161/2013	320	320	640	80	80	320	80
А/С.- Петербург/180/2013	320	320	640	80	80	320	80
А/С.- Петербург/190/2013	320	320	640	160	80	320	80
А/С.- Петербург/195/2013	640	640	1280	160	160	320	160
А/С.- Петербург/198/2013	320	320	640	160	160	320	320
А/С.- Петербург/206/2013	320	320	640	160	160	320	320
А/С.- Петербург/228/2013	320	320	640	160	160	320	320
А/С.- Петербург/220/2013	160	320	320	80	160	160	160
А/С.- Петербург/263/2013	160	320	320	80	160	160	160
А/С.- Петербург/264/2013	320	320	320	80	160	320	320

А/С.- Петербург/168/2013	320	320	640	160	160	320	160
А/С.- Петербург/175/2013	320	320	640	160	160	320	160
А/С.- Петербург/178/2013	320	320	320	80	160	320	160
А/С.- Петербург/274/2013	320	320	320	160	320	320	160
А/С.- Петербург/279/2013	160	320	320	80	160	320	160
А/С.- Петербург/297/2013	160	160	320	80	160	320	160
А/С.- Петербург/296/2013	160	320	320	80	160	160	160
А/С.- Петербург/299/2013	160	320	320	80	160	160	160
А/С.- Петербург/300/2013	160	320	320	80	160	160	160
А/С.- Петербург/312/2013	160	160	320	80	160	160	160
А/С.- Петербург/322/2013	160	320	640	160	320	320	160
А/С.- Петербург/323/2013	160	160	320	80	160	320	160
А/С.- Петербург/324/2013	160	320	320	160	320	320	160
А/С.- Петербург/325/2013	160	320	320	160	320	160	160

А/С.- Петербург/326/2013	160	320	320	160	320	160	160
А/Самара/105/2013	320	640	1280	160	160	160	80
А/Самара/83/2013	640	640	640	160	160	160	160
А/Екатеринбург/ 2/2013	640	320	640	160	160	160	80
А/Екатеринбург/ 11/2013	320	320	1280	160	160	160	80
А/Екатеринбург/ 12/2013	160	320	320	80	80	80	80
А/Екатеринбург/ 8/2013	640	640	640	160	160	320	80
А/Н.Новгород/ 2/2013	160	320	320	160	160	160	160
А/С.- Петербург/5/2009	640	640	640	160	320	320	160
А/С.- Петербург/36/2009	640	640	640	160	320	160	320
А/С.- Петербург/48/2009	320	640	640	160	320	160	80
А/С.- Петербург/82/2009	640	640	640	160	320	160	160
А/С.- Петербург/96/2009	640	640	640	160	320	320	320
А/С.- Петербург/130/2009	640	640	640	80	160	160	320
А/С.- Петербург/182/2009	160	160	160	80	320	160	320

А/С.- Петербург/202/2009	640	640	640	160	320	320	160
А/С.- Петербург/204/2009	160	160	160	160	320	320	160
А/С.- Петербург/04/2010	320	320	320	80	320	320	80
А/С.- Петербург/11/2010	320	320	320	80	320	160	160
А/С.- Петербург/22/2010	160	160	160	160	160	160	80
А/Белгород/3/2009	320	320	320	80	160	160	160
А/Белгород/8/2009	80	640	640	160	320	320	160
А/Белгород/11/2009	80	640	640	160	320	320	160
А/Вологда/3/2009	640	640	640	160	320	640	160
А/Вологда/6/2009	320	320	320	160	320	320	80
А/Астрахань/56/2009	160	320	320	160	160	320	160
А/Астрахань/60/2009	80	160	160	160	160	160	160
А/Воронеж/17/2009	640	640	640	160	320	160	80
А/Воронеж/2/2009	640	640	640	160	320	320	80
А/Омск/22/2009	640	640	640	160	320	320	80
А/Калининград/2/2009 ИГ	320	320	320	80	320	320	160
А/Хабаровск/59/2009	640	320	320	80	160	320	320
А/Чита/11/2009	320	320	320	160	160	320	320

А/Н.Новгород/7/2009	160	320	320	160	320	320	320
А/Смоленск/2/2009	160	160	160	160	320	320	160
А/Н.Новгород/3/2009	640	320	320	160	320	320	160
А/Саратов/4/2009	320	160	160	160	320	320	320
А/Саратов/6/2009	640	640	640	160	320	160	160
А/Саратов/11/2009	640	640	640	160	320	160	160
А/Саратов/8/2009	640	160	160	160	320	320	160
А/Белгород/13/2009	640	320	320	80	320	320	160
А/Белгород/2/2010	160	160	160	80	320	320	160
А/Курск/1/2009	320	640	640	80	320	320	160
А/Курск/2/2009	160	160	160	80	320	320	160
А/С.- Петербург/5/2010	160	160	160	80	160	320	160
А/Псков/2/2009	320	640	640	80	160	320	160
А/Петрозаводск/ 2/2009	320	640	640	80	160	160	160
А/С.- Петербург/1/2011	320	320	320	80	320	160	160
А/С.- Петербург/9/2011	320	320	320	80	320	160	160
А/С.- Петербург/15/2011	640	640	640	160	320	160	160
А/С.- Петербург/39/2011	640	640	640	80	320	320	160
А/С.- Петербург/45/2011	160	160	160	160	320	320	80

А/С.- Петербург/90/2011	640	640	640	160	320	160	160
А/С.- Петербург/123/2011	640	640	640	160	320	160	80
А/С.- Петербург/142/2011	640	320	320	160	320	160	80
А/С.- Петербург/100/2011	320	640	640	80	160	160	80
А/С.- Петербург/108/2011	640	640	640	160	160	160	80
А/С.- Петербург/109/2011	160	80	80	160	160	160	160
А/С.- Петербург/166/2011	640	640	640	80	160	80	160
А/С.- Петербург/170/2011	320	320	320	80	320	320	160
А/Калининград/ 4/2011 ИГ	640	640	640	160	160	160	160
А/Ставрополь/ 4/2011	640	640	640	160	160	320	80
А/Мурманск/1/2011	320	320	320	160	320	160	80
А/Чита/1/2011	640	320	320	160	320	160	80
А/Чита/8/2011	640	320	320	160	160	160	80
А/Краснодар/ 16/2011	640	320	320	160	160	320	160
А/Калуга/1/2011 ИГ	320	320	320	160	160	160	160
А/Воронеж/21/2011	320	320	320	160	160	160	80
А/Москва/24/2011	320	320	320	160	160	160	160

А/Москва/5/2011	320	160	160	80	160	160	80
А/Астрахань/1/2011	160	80	80	80	160	160	80

Приложение 2. Последовательности праймеров для обратной транскрипции и амплификации генома вирусов гриппа
A(H1N1)pdm09.

HA	forward	reverse
fragment 1	1	461
fragment 2	351	943
fragment 3	379	1204
fragment 4	736	1340
fragment 5	1124	1541
fragment 6	1204	1776

NA	forward	reverse
fragment 1	0	600
fragment 2	318	740
fragment 3	536	1063
fragment 4	726	1346
fragment 5	941	1452

