

Г.Г.Онищенко¹, А.П.Агафонов², О.К.Демина², А.А.Сергеев², В.А.Терновой², Л.Н.Шишкина²,
Н.И.Бормотов², А.С.Кабанов², М.О.Скарнович², А.Н.Шиков², А.О.Семенцова², А.М.Шестопапов²,
С.Н.Шпынов², Е.А.Ставский², И.Г.Дроздов²

СВОЙСТВА ШТАММОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;

²ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Первые случаи заболевания, вызванного пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа, на территории Российской Федерации зарегистрированы в конце мая 2009 г. От заболевших были выделены три штамма пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. Свойства выделенных на территории России штаммов были изучены в сравнении с двумя референс-штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v. На основании анализа первичной последовательности генов и при изучении биологических свойств выделенных на территории РФ штаммов было показано их близкое родство со штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v.

Ключевые слова: пандемический (H1N1) 2009 вирус гриппа, агглютинирующая активность, антигенные свойства, лекарственная устойчивость.

В лаборатории Центра контроля за инфекционными заболеваниями (CDC, США) 15 апреля 2009 г. из клинического образца 10-летнего ребенка с выраженными признаками респираторного заболевания (лихорадка, кашель, рвота) был выделен новый вариант вируса гриппа А субтипа H1N1 [7]. Ретроспективный анализ показал, что новый вариант возник после реассортации в геноме штаммов вируса гриппа свиней Евроазиатской линии и штаммов вируса гриппа свиней Североамериканской линии, которая произошла в конце 1990-х в результате взаимодействия субтипов H1N1, H3N2 и H1N2 [5, 8, 9]. Заболевание, вызванное новым вариантом вируса, вначале охватило территории Мексики и США в связи с существующими между этими странами людскими потоками высокой степени интенсивности, а затем с потоком туристов распространилось на территории других государств мира. ВОЗ 11 июня 2009 г. впервые более чем за 40 лет объявила о введении шестого, максимального уровня угрозы – пандемии. К середине июля 2009 г. количество официально подтвержденных случаев заболевания людей пандемическим вирусом гриппа А(H1N1) в мире составило более 105 тыс., из которых более 450 закончились летальным исходом. Единичные случаи и вспышки заболевания были зарегистрированы в 136 странах и обособленных территориях. В Российской Федерации, не имеющей, в отличие от США, столь интенсивных туристических связей с Мексикой и другими странами, в которых наблюдалось эпидемическое распространение указанного заболевания, тем не менее, также были выявлены его единичные случаи. В связи с вышеизложенными фактами было актуальным выделить из клинических образцов российских граждан, больных пандемическим гриппом, штаммы возбудителя и провести их сравнительное изучение со штаммами вируса гриппа, выделенными в США.

Материалы и методы

На территории Российской Федерации из клинического материала заболевших гриппом типа А людей были выделены три штамма вируса и изучены их свойства. При этом в качестве референс-штаммов были использованы штаммы A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, полученные в мае 2009 г. из CDC (США). Штаммы прошли два пассажа на РКЭ.

Сыворотка к штамму A/California/04/2009(H1N1)v была получена следующим образом: мышам линии BALB/c 3-кратно интраназально вводили вирус гриппа на 0, 21 и 37-е сутки в дозе 4,2 lg ТЦД₅₀/животное. Сыворотку крови получали на 20, 36 и 52-е сутки после первичного введения вируса.

Для проведения ОТ-ПЦР использовали РНК, выделенную из клинических образцов набором «РибоСорб» (пр-во «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Реакцию проводили с использованием набора «АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL» (пр-во «ИнтерЛабСервис», Россия) и лабораторных вариантов тест-систем с праймерами, рекомендованными ВОЗ для выявления пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа (праймеры рассчитаны на Н, N, М и NS гены).

Для выделения вируса были использованы 9–10 дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) и культура клеток МДСК.

Для изучения патогенности выделенных изолятов вируса гриппа были использованы мыши (линии BALB/c, CBA, C57Black, ICR, вес 12–14 г), морские свинки (б/п, вес 150–200 г) и кролики (порода шиншилла, вес 1,3–1,5 кг), полученные из питомника ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животные содержались

на стандартном рационе с достаточным количеством воды. Все манипуляции с животными при проведении эксперимента проводили с применением седативных средств в соответствии с ветеринарным законодательством и правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Оценка эффективности лекарственных препаратов проводилась на 5-е сутки после заражения по ингибированию репликации вируса в культуре клеток МДСК (*in vitro*) и по ингибированию репликации вируса в легких у мышей линии ICR (*in vivo*), определяемой титрованием на РКЭ [2].

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами. Вычисление значений 50 % инфицирующих доз вируса гриппа, а также их сравнение проводили по методу Спирмена-Кербера [1].

Результаты и обсуждение

Первые диагностические исследования с пробами, подозрительными на содержание пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, были проведены в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 6 мая 2009 г. Пробы поступили из Управления Роспотребнадзора по Свердловской области и были получены от больной М.О., которая вернулась из туристической поездки с Виргинских островов через США. После проведенных молекулярно-биологических и вирусологических исследований диагноз «заболевание, вызванное вирусом гриппа А субтипа H1N1» не подтвердился.

Первый случай заболевания пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа на территории Российской Федерации был зарегистрирован 22 мая 2009 г. Больной М.Д., гражданин России, прибыл в Москву из Нью-Йорка. Признаки заболевания появились 20 мая, и в ночь на 21 мая он был госпитализирован в инфекционную больницу. От больного забраны образцы мазков из носоглотки и ротоглотки, которые были исследованы на наличие генетического материала (РНК) вируса гриппа методом ОТ-ПЦР и использованы для выделения изолята на чувствительных моделях. В обеих пробах методом ОТ-ПЦР обнаружен генетический материал пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. На 3-и сутки наблюдения за клетками МДСК выявлены изменения монослоя. На 5-е сутки собрана культуральная вируссодержащая жидкость. Методом ОТ-ПЦР подтверждено наличие РНК пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. Титр вируса при титровании на культуре клеток составил $5,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, определенный в РГА с эритроцитами петуха – 1:32.

Всего за период с 6 мая по 1 июля 2009 г. в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» доставлены образцы от 7 больных людей с подозрением на заболевание пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа. В результате проведенных исследований в пяти случаях методом ОТ-ПЦР в клинических образцах больных был об-

наружен генетический материал пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. При этом в четырех случаях РНК пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа выявлены у больных, возвратившихся после поездки в США, и в одном – из Доминиканской Республики. Течение заболевания у всех инфицированных протекало в не осложненной форме и закончилось выздоровлением. Из полученных от 3 больных образцов носоглоточных смывов были выделены изоляты пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, названные согласно рекомендациям WHO OIE & FAO A/Moscow/225/2009(H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v, A/Moscow/227/2009(H1N1)v. Штаммы депонированы в коллекции культур микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор»

Изучение изолятов в РГА показало, что эритроциты кролика, морской свинки, петуха, барана и гуся агглютинируются как референс-штаммом A/California/04/2009(H1N1)v, так и всеми выделенными изолятами, причем эритроциты кролика и морской свинки – в высоких титрах у всех изученных штаммов. Ни один из исследованных штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа не агглютинировал эритроциты макаки резус.

Для изучения патогенности нового пандемического варианта вируса гриппа лабораторным животным интраназально вводили штаммы A/California/04/2009(H1N1)v с титром $6,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ и A/Moscow/225/2009(H1N1)v с титром $6,7 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$. Мышей заражали в объеме 30 мкл, морских свинок – 80 мкл и кроликов – 150 мкл. За животными наблюдали в течение 16 сут. На 5-е сутки после заражения у животных забирали легкие и определяли наличие РНК вируса гриппа методом ОТ-ПЦР. В легких мышей всех линий обнаружена РНК вируса гриппа. В легких морских свинок и кроликов РНК вируса гриппа не выявлена. Инфекция, вызванная пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа, для всех видов животных была не летальной. Следует отметить, что последовательное, интраназальное, проведенное по схеме 0, 21, 37-е сутки, заражение мышей линии BALB/c дозой вируса $4,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{животное}$, штамм A/California/04/2009(H1N1)v, приводило к репродукции вируса в легких (табл. 1). При изучении штаммов в реакции торможения геагглютинации (РТГА) было показано (табл. 1), что выделенные изоляты пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа A/Moscow/225/2009(H1N1)v и A/Moscow/226/2009(H1N1)v находятся в близком антигенном родстве с полученными из CDC штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v. Были определены значения 50 % инфицирующих доз штаммов вирусов гриппа для мышей, которые составили $1,1 \pm 0,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$ для штамма A/California/04/2009(H1N1)v и $0,59 \pm 0,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$ – для штамма A/Moscow/225/2009(H1N1)v.

Выделенные изоляты были проверены на восприимчивость к действию противогриппозных

Таблица 1

Результаты эксперимента по и/н заражению мышей линии BALB/c штаммом A/California/04/2009(H1N1)v пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа

Используемый для постановки РГА антиген	Наличие РНК пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа в легких/титр сыворотки в РТГА/срок получения образцов (сут) от первичного введения вируса					
	Однократное введение вируса		Двукратное введение вируса		Трехкратное введение вируса	
	Наличие РНК ¹	РТГА	Наличие РНК ²	РТГА	Наличие РНК ³	РТГА
A/California/04/2009(H1N1)v	+	1:400	+	1:3200	+	1:51200
A/Moscow/225/2009(H1N1)v	+	1:200	+	1:800	+	1:12800
A/Moscow/225/2009(H1N1)v	+	1:200	+	1:800	+	1:12800
A/Moscow/225/2009(H1N1)v	+	1:200	+	1:400	+	1:12800
Контроль 1 A/Novosibirsk 01/2009(H1N1)*		1:100		1:100		1:400
Контроль 2 A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 (H5N1)**		<1:50		<1:50		<1:50

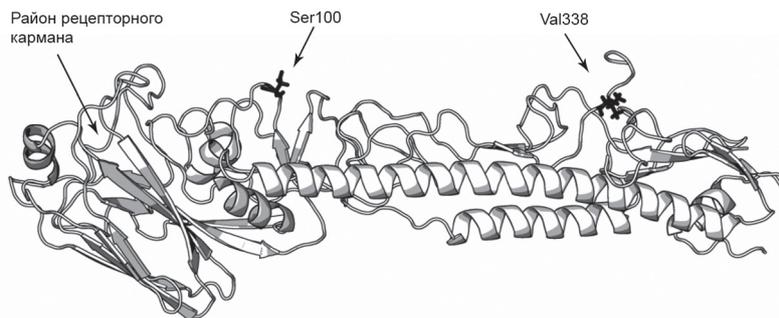
Примечания: ¹ – РНК вируса определяли в легких, полученных через 5 сут после первичного введения вируса; ² – РНК вируса определяли в легких, полученных через 5 сут после вторичного введения вируса; ³ – РНК вируса определяли в легких, полученных через 5 сут после третьего введения вируса; * – штамм «сезонного» вируса гриппа, выделенного от больного в г. Новосибирске в сезон 2008–2009 г.; ** – штамм вируса гриппа А субтипа H5N1, выделенного на территории Новосибирской области в 2005 г.

препаратов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Проведенные исследования показали, что штаммы A/Moscow/225/2009 (H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v, A/Moscow/227/2009(H1N1)v (табл. 2), как и штаммы A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v чувствительны к действию ремантадина, ингавирина, реферона и тамифлю при изучении противовирусной активности *in vitro*. В экспериментах на мышах было установлено, что изученные штаммы обладают восприимчивостью к действию ингавирина, ремантадина, рибавирина, реферона и тамифлю при использовании терапевтических доз, эквивалентных установленным для лечения человека.

Последовательности генов выделенных изолятов были секвенированы и депонированы в международной базе данных GenBank. Анализ последовательностей генов NA и M изолятов, выделенных на территории России, подтвердил, что оба гена схожи

с соответствующими геномами вируса гриппа свиной субтипа H1N1 Евроазиатской линии – A/Swine/England/195852/92(H1N1) с процентом гомологии 94 %. Изучение PB1, PB2, PA, NP, NS генов свидетельствует о том, что выделенные изоляты имеют сходство со штаммами вируса гриппа А субтипа H1N2, циркулирующего на территории Северной или Центральной Америки в 1999–2001 гг. среди свиней. При этом гомология нуклеотидных последовательностей со штаммами A/Swine/Indiana/9K035/99, A/Swine/Indiana/P12439/00, A/Swine/Minnesota/55551/00 и A/Swine/Illinois/100084/01 составляет 96 %. Ген гемагглютинаина также наиболее близок к гену гемагглютинаина штаммов субтипа H1N2. Анализ участка последовательности гена гемагглютинаина, отвечающего за взаимодействие с рецептором Neu5Aca2-6GalH1 человека (Asp190—Gln192—Ser193—Lys222—Asp225—Gln226), показал, что замены, характерные для «свиных» штаммов, присутствуют и у штаммов

	100	214	220	251	338
A/California/07/2009 (H1N1)v	... S S W S Y I V E T P	... N A D A Y V F V G S	... V E P G D K I T F E	... I A T G L R N I P S	...
A/California/04/2009 (H1N1)v T
A/SaoPaulo/1454/2009 (H1N1)v
A/Moscow/225/2009 (H1N1)v T	... T	... V
A/Moscow/226/2009 (H1N1)v T V
A/Moscow/227/2009 (H1N1)v T V



Схематичное изображение пространственной структуры гемагглютинаина штамма A/Moscow/226/2009(H1N1)v с элементами вторичной структуры. Стрелками на модели структуры гемагглютинаина указаны участок рецепторного кармана [6] и аминокислотные остатки Ser100 и Val338, их боковые радикалы окрашены в черный цвет

Чувствительность штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа к противовирусным препаратам

Штаммы вируса гриппа	Индексы нейтрализации (ИД ₅₀ опыт – ИД ₅₀ контроль, в lg, ±I ₉₅) вируса при использовании разных доз препаратов									
	Тамифлю			Ингавирин		Римантадин		Реаферон		
	<i>in vitro</i> , (МКГ/мл)		<i>in vivo</i> (МГ/г)	<i>in vitro</i> (МКГ/мл)	<i>in vivo</i> (МГ/г)	<i>in vitro</i> (МКГ/мл)	<i>in vivo</i> (МГ/г)	<i>in vitro</i> (МЕ/мл)		<i>in vivo</i> (МЕ/г)
	100	10	0,025	200	0,015	10	0,05	250000	100000	100
A/California/04/2009(H1N1)v	2,4±0,4	1,7±0,4	1,3±0,5	0,6±0,2	1,0±0,5	0,5±0,6	0,8±0,5	1,0±0,6	0,9±0,4	0,5±0,5
A/California/07/2009(H1N1)v	2,2±0,4	1,2±0,2	1,3±0,5	0,7±0,3	1,0±0,5	0,5±0,5	0,8±0,5	1,6±0,5	1,2±0,7	0,5±0,5
A/Moscow/225/09(H1N1)v	2,4±0,5	1,2±0,2	1,0±0,5	0,7±0,4	0,8±0,5	0,4±0,7	0,3±0,5	1,4±0,4	1,0±0,3	0,5±0,5
A/Moscow/226/09(H1N1)v	2,1±0,4	1,2±0,2	1,0±0,6	0,8±0,5	0,8±0,6	0,3±0,6	0,3±0,6	1,4±0,4	0,9±0,2	0,5±0,6
A/Novosibirsk/01/09(H1N1)v	2,2±0,4	1,3±0,1	1,0±0,4	0,6±0,2	0,8±0,4	0,7±0,5	0,5±0,4	1,0±0,6	0,9±0,4	0,6±0,4
A/Turkey/Suzdalka/ Nov-1/2005 (H5N1)	2,9±0,4	1,2±0,2	2,0±0,5	1,1±0,2	н/о	1,1±0,5	0,8±0,5	1,2±0,4	0,7±0,5	1,3±0,5
A/Aichi/2/68(H3N2)	2,7±0,4	1,4±0,1	2,3±0,5	0,5±0,4	н/о	0,5±0,4	0,3±0,5	0,8±0,4	0,5±0,3	1,0±0,5

Примечание: н/о – не определяли.

A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v так же, как и в штаммах A/Moscow/225/2009(H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v, A/Moscow/227/2009(H1N1)v [3, 4]. Анализ доступных в базе данных GenBank 585 последовательностей гена гемагглютинина показал, что значимых с точки зрения изменения конформации рецепторного «кармана» замен у штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа не произошло. В позициях 100, 220 и 338 Н гена штаммов, выделенных на территории России, были найдены повторяющиеся мутации. Эти мутации обнаружены в большинстве штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, однако в штаммах A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v, геномы которых были использованы нами как референс последовательности, эти мутации отсутствуют. Интересно отметить, что аминокислота изолейцин в позиции 338 встречается только в последовательностях, содержащих пролин в позиции 100. Аминокислотные замены Pro100Ser и Ile338Val, характерные для штаммов A/Moscow/225/2009(H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v и A/Moscow/227/2009(H1N1)v, расположены в петлевых районах «ножки» гемагглютинина и, по-видимому, не участвуют ни в связывании гликанов, ни в тримеризации и, следовательно, существенным образом не влияют на структурно-функциональные свойства молекулы гемагглютинина. Кроме того, замена Ile338Val является консервативной, поскольку по своим физико-химическим характеристикам и структурным особенностям эти аминокислотные остатки очень близки.

Таким образом, были изучены свойства трех штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, выделенных на территории Российской Федерации, и двух референс штаммов, полученных из CDC. Штаммы пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа репродуцировались в монослойной культуре клеток МДСК, 9–10-дневных РКЭ и легких мышей 4 линий, агглютинировали эритроциты кро-

лика, морской свинки, петуха, барана, гуся и не агглютинировали эритроциты макаки резус. Штаммы вируса гриппа оказались в разной степени чувствительными к действию противогриппозных препаратов, используемых на территории России. На основании анализа первичной последовательности генов и при изучении антигенных свойств выделенных на территории России изолятов показано их близкое родство со штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. 118 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармацевтических веществ. Под ред. чл.-корр. РАМН Хабриева Р.У. М.: Медицина; 2005. 832 с.
3. Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26:107–13.
4. Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., et al. Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105:2800–5.
5. Garten R.J., Davis C. T., Russell C.A. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science, sciencexpress.* 2009; 1126/1176225:1-10.
6. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000; 74: 8502-12.
7. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360:2605–15.
8. Shinde V., Bridges C.B., Uyeki T.M., et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005–2009. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360:1–10.
9. Zimmer S.M., Burke D.S. Historical perspective – emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 279–85.

Об авторах:

Онищенко Г.Г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.
Агафонов А.П., Демина О.К., Сергеев А.А., Терновой В.А., Шишкина Л.Н., Бормотов Н.И., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Шиков А.Н., Семенцова А.О., Шестопалов А.М., Шынов С.Н., Стаский Е.А., Дроздов И.Г. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

G.G.Onischenko, A.P.Agafonov, O.K.Demina, A.A.Sergeev, V.A.Ternovoy, L.N.Shishkina, N.I.Bormotov, A.S.Kabanov, M.O.Skarnovich, A.N.Shikov, A.O.Sementsova, A.M.Shestopalov, S.N.Shpynov, E.A.Stavskiy, I.G.Drozdov

Properties of Pandemic Influenza Virus Strains Isolated in the Territory of Russia

Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer's Rights Protection and Human Welfare, Moscow; State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

The first cases of the disease caused by pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in the territory of the Russian Federation were registered at the end of May, 2009. 3 strains of pandemic (H1N1)2009 influenza virus were isolated from patients. Properties of the strains isolated in the territory of Russia were studied in comparison with those of two reference strains A/California/04/2009(H1N1) and A/California/07/2009(H1N1)v. Analysis of

primary gene sequence and examination of biological properties of the strains isolated in the territory of Russia suggested their close relationship with A/California/04/2009(H1N1)v and A/California/07/2009(H1N1)v strains.

Key words: pandemic (H1N1) 2009 influenza virus, agglutinating activity, antigenic properties, drug resistance.

Authors:

Onischenko G.G. Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer's Rights Protection and Human Welfare. Moscow.

Agafonov A.P., Demina O.K., Sergeev A.A., Ternovoy V.A., Shishkina L.N., Bormotov N.I., Kabanov A.S., Skarnovich M.O., Shikov A.N., Sementsova A.O., Shestopalov A.M., Shpynov S.N., Stavskiy E.A., Drozdov I.G. State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector". 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 22.07.09.