

УДК 578.832.1А(571)

О. Г. Курская¹, И. М. Сулопаров², А. Г. Дурыманов¹, М. Б. Игнашкина¹,
А. В. Глущенко², А. М. Шестопапов², Т. Н. Ильичева¹

¹ Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия
E-mail: ilyichev@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ГРИППА А / H1N1 В СИБИРСКОМ И ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ РЕГИОНАХ (СЕЗОН 2009–2010) *

Выделено 56 изолятов пандемического вируса гриппа А (H1N1) и исследованы молекулярно-генетические свойства 23 штаммов, циркулировавших в Сибирском и Дальневосточном регионах в сезон 2009–2010 гг. Проведен ретроспективный анализ уровня популяционного иммунитета к вирусу гриппа А / H1N1 pdm у жителей этих регионов. Показано, что в сезон 2009–2010 гг. около 30 % населения Амурской области контактировало с пандемическим вирусом гриппа А / H1N1.

Ключевые слова: вирус гриппа, H1N1, пандемия, Сибирь, Дальний Восток.

Весной 2009 г. ранее неизвестный вариант вируса гриппа А (H1N1) вызвал подъем заболеваемости в Северной Америке [1] и Мексике [2]. Данный вирус генетически и по антигенным свойствам значительно отличается от штаммов сезонного вируса гриппа А (H1N1), циркулирующих в мире последние 30 лет. Исследования показали, что он является тройным реассортантом и содержит генетический материал птичьего, человеческого и свиного вирусов гриппа типа А [3]. Отсутствие иммунитета у основной части населения планеты позволило новому варианту вируса чрезвычайно быстро распространиться во всем мире, поэтому ВОЗ объявила о начале первой пандемии гриппа в XXI в.

В России первый случай заболевания, вызванного пандемическим вирусом гриппа А (H1N1), зарегистрирован 18.05.2009 у туриста, вернувшегося из США [4]. Вирус молниеносно распространился по территории Российской Федерации. Уже в июле

2009 г. появились лабораторно подтвержденные случаи заболевания людей в Екатеринбурге, Томске, Барнауле и Владивостоке. Первые летальные исходы зарегистрированы в Читинской и граничащей с ней Амурской областях. Наибольший подъем заболеваемости, вызванной пандемическим гриппом, зафиксирован в Амурской области.

Цель исследования: выделить и исследовать молекулярно-генетические свойства вируса пандемического гриппа А (H1N1), циркулировавшего в Сибири и на Дальнем Востоке РФ осенью 2009 г., а также выявить уровень антител в сыворотке крови обследованных лиц, образцы которых получены в сезон 2009–2010 гг., к серотипам вируса гриппа А.

Материал и методы

Вирус гриппа выделяли из носоглоточных смывов, полученных от пациентов с предва-

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ФЦП, Госконтракта № 14.740.11.0247 и гранта по государственной поддержке ведущей научной школы Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

рительным диагнозом гриппа или секционного материала (10 % гомогенат на растворе Хенкса). Гомогенат или транспортную среду, содержащую клинический материал, центрифугировали при 400G в течение 10 мин и инокулировали в культуральные планшеты с монослойной культурой MDCK. Репродукцию вируса контролировали визуально по цитопатическому действию и в реакции гемагглютинации (РГА) с эритроцитами гуся и человека. Проведение работ с клиническими образцами (носоглоточные смывы, секционный материал, сыворотка крови) одобрено решением этического комитета IRB 00001360 (протокол № 2 от 20.05.2008).

Для определения нуклеотидной последовательности генома РНК вируса выделяли с помощью набора «SV Total RNA Isolation System» («Promega Corporation», США) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с праймерами Uni12 с использованием AMV обратной транскриптазы («Fermentas», Литва). ПЦР проводили со специфическими к каждому сегменту вирусной РНК праймерами, рекомендованными ВОЗ [5]. Продукты амплификации выделяли с помощью QIAquick gel extraction kit («QIAGEN», США) и затем секвенировали по обеим цепям ДНК по прямому и обратному праймерам M13 на автоматическом секвенаторе 3130x1 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). При анализе полученных нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ Vector NTI Advance 10 («Invitrogen», США).

Образцы сыворотки крови получены от клинически здоровых людей. Всего было проанализировано 1366 образцов. Наличие в сыворотке поликлональных антител к вирусу гриппа А серотипов H1N1 (пандемический), H1N1 (сезонный) и H3N2 тестировали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с эритроцитами гуся и человека, используя общепринятую методику [6]. Антигены пандемического А (H1) и сезонных А (H1) и А (H3) серотипов вируса гриппа для проведения реакции РТГА получены инаktivацией бета-пропиолактоном штаммов вируса гриппа А/California/04/09 (H1N1), А/New Caledonia/20/99 (H1N1) и А/New York/55/2005 (H3N2), доставленных из Центра по контролю за заболеваемостью (CDC, Атланта, США). Перед работой все

сыворотки обработаны препаратом RDE («Denka Seiken», Япония), разрушающим неспецифические ингибиторы. Сыворотку считали положительной, если обратный титр антител был равен или больше 40 [6].

Для определения статистической достоверности различий в титрах между возрастными группами пациентов применяли критерий χ^2 . Расчет проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0. Значение $p < 0,05$ расценивали как статистически значимое.

Результаты исследования и обсуждение

Из 238 клинических образцов и секционного материала, полученных от больных в Центральной и Западной Сибири, на Дальнем Востоке в сезон 2009–2010 гг., выделено 56 изолятов вируса гриппа А / H1N1pdm, из них для 21 штамма получены нуклеотидные последовательности полного генома, для А/Tumen/CRIEKIN/2009 и А/Yakutsk/CrieEAV/2009 – последовательности генов гемагглютинина и нейраминидазы. Все последовательности депонированы в международную базу данных GenBank (табл. 1).

По нуклеотидным последовательностям генов выведены соответствующие им аминокислотные последовательности белков. При сравнении полученных последовательностей с соответствующими последовательностями референс-штамма вируса пандемического гриппа А/California/04/2009 обнаружено 20 аминокислотных замен для гемагглютинина (HA), 10 – для нейраминидазы (NA), по две замены в матричном белке M1 и белке M2, 4 – в нуклеопротеидном белке (NP), 17 – в белках полимеразного комплекса: 4 замены в PA, 8 – в PB1 и 5 – в PB2, 5 – в неструктурном белке NS1 и одна замена в белке NS2.

Подобно референс-штамму А/California/04/09 (H1N1), нейраминидаза не содержит характерных мутаций (E-119, H-275, R-293, N-295), обуславливающих резистентность вируса к ингибиторам этого фермента (озельтамивир – препарат Тамифлю, занамивир – препарат Реленза) [7]. Обнаружены две мутации, отвечающие за высокую вирулентность для млекопитающих: I-29 и Q-39, которые также наблюдаются у вируса сезонного гриппа H1N1 и гриппа свиней [8]. У всех штаммов в M2-белке из характерных

Таблица 1

Номера нуклеотидных последовательностей генов в GenBank

| Штамм | Белок | | | | | | | |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | HA | NA | MP | NP | NS | PA | PB1 | PB2 |
| A/Abakan/02/2009 | GU367315 | GU367316 | н/д* | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д |
| A/Barnaul/04/2009 | GU592889 | GU592891 | GU592890 | GU592892 | GU592893 | GU592894 | GU592895 | GU592896 |
| A/Blagovechensk/01/2009 | HM173599 | HM173601 | HM173600 | HM173602 | HM173603 | HM173604 | HM173605 | HM173606 |
| A/Chita/01/2009 | GU271944 | GU234175 | GU234174 | GU234176 | GU234177 | GU234180 | GU234178 | GU234179 |
| A/Habarovsk/01/2009 | GU480939 | GU480940 | GU480941 | GU480942 | н/д | н/д | н/д | н/д |
| A/Kurgan/01/2009 | GU480943 | GU480945 | GU480944 | GU480946 | GU480947 | н/д | н/д | н/д |
| A/Karasuk/01/2010 | GU562458 | GU562460 | GU562459 | GU562461 | GU562462 | GU562463 | GU562464 | GU562465 |
| A/Irkutsk/02/2009 | GQ505853 | GQ505855 | GQ505854 | GQ505856 | GQ505857 | GU480936 | GU480934 | GU480935 |
| A/Magadan/02/2009 | GU592905 | GU592907 | GU592906 | GU592908 | GU592909 | GU592910 | GU592911 | GU592912 |
| A/Novosibirsk/02/2009 | GU433033 | GU433035 | GU433034 | GU433036 | GU433037 | GU433038 | GU433039 | GU433040 |
| A/Omsk/02/2009 | GU211235 | GU211237 | GU211236 | GU211238 | GU211239 | GU211240 | GU211241 | GU211242 |
| A/Omsk/01/2009 | GQ527167 | GQ527169 | GQ527168 | GQ527170 | GQ527171 | н/д | н/д | н/д |
| A/Salekhard/01/2009 | GU367327 | GU367329 | GU367328 | GU367330 | GU367331 | GU367332 | GU367333 | GU367334 |
| A/Tomsk/01/2009 | GQ426218 | GQ426220 | GQ426219 | GQ426221 | GQ426222 | GU234173 | GU234171 | GU234172 |
| A/Tomsk/03/2009 | GU433025 | GU433027 | GU433026 | GU433028 | GU433029 | GU433030 | GU433031 | GU433032 |
| A/Tomsk/02/2009 | GU211243 | GU211245 | GU211244 | GU211246 | GU211247 | GU211248 | GU211249 | GU211250 |
| A/Tomsk/05/2009 | GU560008 | GU560010 | GU560009 | GU560011 | GU560012 | GU560013 | GU560014 | GU560015 |
| A/Tomsk/06/2009 | GU560016 | GU560018 | GU560017 | GU560019 | GU560020 | GU560021 | GU560022 | GU560023 |
| A/Tomsk/07/2009 | GU367317 | GU367319 | GU367318 | GU367320 | GU367321 | GU367322 | GU367323 | GU367324 |
| A/Tomsk/08/2009 | GU480938 | GU480937 | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д |
| A/Tumen/CRIEKIN/2009 | HM189381 | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д |
| A/Vladivostok/01/2009 | GU211219 | GU211221 | GU211220 | GU211222 | GU211223 | GU211224 | GU211225 | GU211226 |
| A/Yakutsk/CrieEAV/2009 | HM189358 | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д | н/д |

* н/д – нуклеотидная последовательность гена не депонирована в GenBank.

мутаций (L26, V27, A30, S31, G34) [9] присутствует одна замена S31N, т. е. серин замещен аргинином, что свидетельствует о резистентности к лекарственным препаратам адамантанового ряда.

В отношении другого противогриппозного средства – арбидол – анализ аминокислотной последовательности белка HA, точнее его субъединицы HA2, показал, что данные штаммы не имеют характерных мутаций (Q27, Q42, K51, K116), ответственных за резистентность гриппа к арбидолу [10].

В аминокислотной последовательности белка NS1, который, по-видимому, имеет важное значение для вирулентности вируса гриппа, мы не обнаружили делецию пяти аминокислотных остатков (позиция 80–84), которая характерна для вирусов с типом Z-генома. Это, вероятно, придает им свойство вызывать повышенную экспрессию ФНО- α и интерферон- γ -индуцируемого белка (IP-10) в макрофагах человека [11]. Белок NS1 штамма A/California/04/09 содержит D-92 (аспартат) аминокислоту, что типично для птичьих вирусов. Присутствие глутаминовой кислоты (E) в позиции 92 позволяет вирусу ингибировать продукцию интерферона в зараженных клетках, т. е. эта мутация должна снижать вирулентные свойства данных штаммов [12].

Определенные аминокислотные замены в вирусном полимеразном комплексе, который формируется из трех белков (PB1, PB2, PA), могут быть связаны с адаптацией и ви-

рулентностью вирусов. В белке PB2, в позиции 627 обнаружен лизин. Это является показателем того, что данные штаммы не способны к большой продуктивности при пониженной температуре в верхних дыхательных путях [13]. Возможно, потому нами наблюдался больший, чем обычно, процент (до 40 %, по данным [14; 15]) диареи и других нарушений функционирования желудочно-кишечного тракта у больных с пандемическим гриппом.

Антигенные характеристики штаммов изучали в реакции торможения гемагглютинации с референс-сывороткой к вирусу A/California/04/2009. Все выделенные штаммы по антигенным свойствам не отличались от референс-штамма.

Для оценки популяционного гуморального иммунитета к вирусу гриппа проанализировано 1 566 образцов сывороток крови, полученных у лиц, проживающих на Дальнем Востоке, в Центральной и Западной Сибири. Через месяц после вспышки пандемического гриппа получены 574 сыворотки от жителей Амурской области (табл. 2).

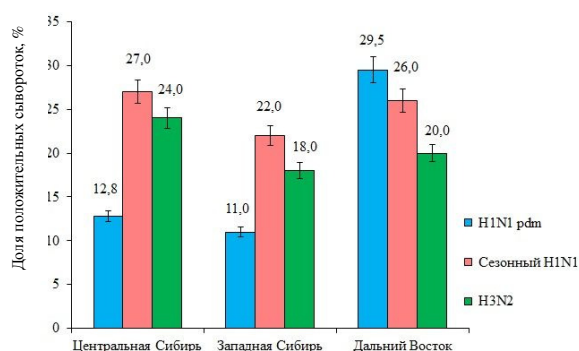
Антитела к А (H1N1) pdm в диагностических титрах (≥ 40) определены у 201 (35 %) из 574 обследованных. Половина (46,3 %) серопозитивных лиц оказалась людьми моложе 30 лет, причем некоторые из них имели очень высокие значения титров антител (160 и выше). Только 20,1 % людей старше 30 лет имели диагностические титры антител к вирусу пандемического гриппа.

Таблица 2

Положительные сыворотки к пандемическому и сезонному вирусу гриппа среди образцов, полученных от пациентов в Амурской области, абс. (%)

| Возраст, лет | n | Количество сывороток с титром антител ≥ 40 | | |
|--------------|-----|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | | к вирусу пандемического гриппа А (H1N1) | к вирусу сезонного гриппа А (H1N1) | к вирусу сезонного гриппа А (H3N2) |
| До 18 | 75 | 47 (62,7) | 49 (65,3) | 26 (34,7)** |
| 18–30 | 221 | 98 (44,3)* | 72 (32,6)* | 59 (26,7) |
| 30–45 | 166 | 37 (22,3)* | 72 (43,4)* | 50 (30,2) |
| 45–60 | 112 | 19 (17,0)* | 34 (30,3)* | 36 (32,1) |
| Всего | 574 | 201 (35,0) | 227 (39,5) | 172 (29,8) |

Примечание: * – достоверность отличия показателей по сравнению с группой лиц в возрасте до 18 лет, имеющих антитела против пандемического или сезонного вируса гриппа при $p < 0,001$; ** – достоверность отличия показателей по сравнению с группой лиц до 18 лет, имеющих антитела к сезонному вирусу гриппа А (H1N1) при $p < 0,001$.



Доля положительных сывороток к пандемическому и сезонному вирусу гриппа у жителей Сибирского и Дальневосточного регионов в сезон 2009–2010 гг., %

Для того чтобы приблизительно оценить количество людей, перенесших в сезон 2009–2010 гг. пандемический грипп, проанализированы 992 сыворотки, полученные от жителей Дальнего Востока, Центральной и Западной Сибири (см. рисунок).

Наибольший процент образцов сыворотки, положительных к пандемическому вирусу (29,5 %), получен из Дальневосточного региона; в Центральной и Западной Сибири этот показатель оказался более чем в два раза ниже: 12,8 и 11,0 % соответственно. В сыворотках, собранных до начала пандемии, антитела к вирусу A (H1N1) pdm определяли только в 6 ± 4 % образцах (данные не представлены). На основе ретроспективного анализа сывороток следует, что жители Дальневосточного региона более значительно пострадали от пандемического гриппа в изученный сезон по сравнению с людьми, проживающими в Центральной и Западной Сибири.

Заключение

Результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что штаммы пандемического вируса гриппа, выделенные на территории Сибири и Дальнего Востока, по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям на 99 % и выше идентичны референс-штамму A/California/04/2009. Единичные замены в антигенных сайтах не изменили антигенные характеристики выделенных штаммов, поскольку в реакции торможения гемагглютинации они взаимодействовали с референс-сывороткой в тех же

разведениях, что и референс-штамм. По результатам ретроспективных исследований образцов сыворотки крови жителей Сибири и Дальнего Востока можно сделать вывод, что в сезон 2009–2010 гг. в азиатской части России люди пострадали от пандемии гриппа больше, в частности в Дальневосточном регионе.

Список литературы

1. CDC. Swine Influenza A (H1N1) Infection in Two Children – Southern California, March–April 2009 // *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2009. Vol. 58, № 15. P. 400–402.
2. CDC. Outbreak of Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Infection – Mexico, March–April 2009 // *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2009. Vol. 58, № 17. P. 467–470.
3. Garten R. J., Davis C. T., Russell C. A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W. M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C. B., Emery S. L., Hillman M. J., Rivailler P., Smagala J., de Graaf M., Burke D. F., Fouchier R. A., Pappas C., Alpuche-Aranda C. M., Lopez-Gatell H., Olivera H., Lopez I., Myers C. A., Faix D., Blair P. J., Yu C., Keene K. M., Dotson P. D. Jr., Boxrud D., Sambol A. R., Abid S. H., St George K., Bannerman T., Moore A. L., Stringer D. J., Blevins P., Demmler-Harrison G. J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman S., Smole S., Guevara H. F., Belongia E. A., Clark P. A., Beatrice S. T., Donis R., Katz J., Finelli L., Bridges C. B., Shaw M., Jernigan D. B., Uyeki T. M., Smith D. J., Klimov A. I., Cox N. J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans // *Science.* 2009. Vol. 325. P. 197–201.
4. Romanovskaia A. A., Durymanov A. M., Sharshov K. A., Zaikovskaia A. V., Suslopov I. M., Shestopalov A. M., Leneva I. A., Drozdov I. G. Investigation of Susceptibility of Influenza Viruses A (H1N1), the Cause of Infection in Humans in April–May 2009, to Antivirals in MDCK Cell Culture // *Antibiot. Khimioter.* 2009. Vol. 54, № 5–6. P. 41–47.
5. Pandemic (H1N1) 2009 Guidance Documents. URL: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/en/> (дата обращения: 21.01.2011).
6. Rowe T., Abernathy R. A., Hu-Primer J., Thompson W. W., Lu X., Lim W., Fukuda K., Cox N. J., Katz J. M. Detection of Human Se-

- rum Antibody to Avian Influenza A (H5N1) Virus Using a Combination of Serologic Assays // *J. Clin. Microbiol.* 1999. Vol. 37. P. 937–943.
7. Jong M. D. de, Tran T. T., Truong H. K., Vo M. H., Smith G. J., Nguyen V. C., Bach V. C., Phan T. Q., Do Q. H., Guan Y., Peiris J. S., Tran T. H., Farrar J. Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection // *N. Engl. J. Med.* 2005. Vol. 353. P. 2667–2672.
8. Chen H., Bright R. A., Subbarao K., Smith C., Cox N. J., Katz J. M., Matsuoka Y. Polygenic Virulence Factors Involved in Pathogenesis of 1997 Hong Kong H5N1 Influenza Viruses in Mice // *Virus Research.* 2007. Vol. 128, № 1–2. P. 159–163.
9. Jing X., Ma Ch., Ohigashi Y. et al. Functional Studies Indicate Amantadine Binds to the Pore of the Influenza A Virus M2 Proton-Selective Ion Channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105, № 31. P. 10967–10972.
10. Leneva I. A., Russell R. J., Boriskin Y. S., Hay A. J. Characteristics of Arbidol-Resistant Mutants of Influenza Virus: Implications for the Mechanism of Anti-Influenza Action of Arbidol // *Antiviral. Research.* 2009. Vol. 81, № 2. P. 132–140.
11. Guan Y., Poon L. L., Cheung C. Y., Ellis T. M., Lim W., Lipatov A. S., Chan K. H., Sturm-Ramirez K. M., Cheung C. L., Leung Y. H., Yuen K. Y., Webster R. G., Peiris J. S. H5N1 Influenza: A Pro-Tean Pandemic Threat // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. P. 8156–8161.
12. Obenauer J. C., Denson J., Mehta P. K., Su X., Mukatira S., Finkelstein D. B., Xu X., Wang J., Ma J., Fan Y., Rakestraw K. M., Webster R. G., Hoffmann E., Krauss S., Zheng J., Zhang Z., Naeve C. W. Large-Scale Sequence Analysis of Avian Influenza Isolates // *Science.* 2006. Vol. 311. P. 1576–1580.
13. Fraser C., Donnelly C. A., Cauchemez S., Hanage W. P., van Kerkhove M. D., Hollingsworth T. D., Griffin J., Baggaley R. F., Jenkins H. E., Lyons E. J., Jombart T., Hinsley W. R., Grassly N. C., Balloux F., Ghani A. C., Ferguson N. M., Rambaut A., Pybus O. G., Lopez-Gatell H., Alpuche-Aranda C. M., Chapela I. B., Zavala E. P., Guevara D. M., Checchi F., Garcia E., Hugonnet S., Roth C. Pandemic Potential of a Strain of Influenza A (H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans // *Science.* 2009. Vol. 325. P. 197–201.
14. Dawood F. S., Jain S., Finelli L., Shaw M. W., Lindstrom S., Garten R. J., Gubareva L. V., Xu X., Bridges C. B., Uyeki T. M. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 360. P. 2605–2615.
15. Riquelme A., Alvarez-Lobos M., Pavéz C., Hasbun P., Dabanch J., Cofre C., Jimenez J., Calvo M. Gastrointestinal Manifestations among Chilean Patients Infected with Novel Influenza A (H1N1) 2009 Virus // *Gut.* 2009. Vol. 58. P. 1567–1568.

Материал поступил в редколлегию 21.01.2011

O. G. Kurskaya, I. M. Susloparov, A. G. Durymanov, M. B. Ignashkina,
A. V. Gluschenko, A. M. Shestopalov, T. N. Ilyicheva

**RESEARCH OF PANDEMIC INFLUENZA A / H1N1 VIRUS
IN RUSSIAN ASIA IN 2009–2010**

The 56 influenza A / H1N1 pdm viruses were isolated during 2009–2010 from samples collected in Central and Western Siberia and Far East. There were studied molecular-genetic properties of 23 strains. We carried out retrospective analysis of the level of herd immunity to influenza virus A / H1N1pdm in those regions residents. It was shown that during 2009–2010 about 30 % of the Amur Region population had contacts with influenza virus A / H1N1.

Keywords: influenza virus, H1N1, influenza pandemic, Siberia, Far East.