

(FluMist) derived from cold – adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*. 2003; 306: 18–24.

11. Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble J. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004; 78: 995–8.
12. Kendal A. P., Maassab H. F., Alexandrova G. I., Ghendon Y. Z. Development of cold-adapted recombinant live attenuated influenza A vaccines in the USA and USSR. *Antiviral Res.* 1981; 1: 339–65.

13. Klimov A. I., Kiseleva I. V., Alexandrova G. I., Cox N. J. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus. *International Congress Series*. 2001; 1219: 955–59.
14. Maassab H. Adaptation and growth characterization of influenza virus at 25°C. *Nature*. 1967; 213: 612–4.
15. Reed L. I., Muench H. A simple method of estimation fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–97.

Поступила 31.05.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.921.5-084:614.4

А. А. Соминина, М. П. Грудинин, М. Ю. Еропкин, Е. А. Смородинцева, М. М. Писарева, А. Б. Комиссаров, Н. И. Коновалова, Д. М. Даниленко, Т. М. Гудкова, О. И. Киселев

Развитие надзора за гриппом в России в системе национального центра ВОЗ по гриппу

ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

Представлен анализ развития эпидемии гриппа сезона 2010–2011 г. Установлена ведущая роль вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и В Викторианской линии в структуре эпидемической заболеваемости при небольшом участии вируса А(H3N2). По антигенным свойствам выделенные в России вирусы оказались родственными штаммам, введенным в состав вакцин. Дрейф-варианты вируса А(H1N1)pdm09, выделенные в Астрахани и Санкт-Петербурге, были признаны сотрудничающим центром (СЦ) ВОЗ в Лондоне в качестве родоначальников трех новых генетических групп возбудителя.

Ключевые слова: *грипп, заболеваемость, ПЦР, ИФ, генетический анализ*

Development of Influenza Surveillance in Russia in the System of the WHO National Influenza Center

A. A. Sominina, M. P. Grudinina, M. Yu. Eroppkin, E. A. Smorodintseva, M. M. Pisareva, A. B. Komissarov, N. I. Konvalova, D. M. Danilenko, T. M. Gudkova, and O. I. Kiselev

Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Analysis of development influenza activity season 2010–2011 is presented. Significant participation of influenza A(H1N1)pdm09 virus and influenza B of Victoria lineage virus in the epidemic morbidity structure with minor participation of A(H3N2) virus was revealed. The influenza viruses isolated in Russia according to antigenic properties were similar to the strains included in the vaccine composition. Drift variants of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in Astrakhan and St.-Petersburg were recognized using WHO CC in London as representatives of three new genetic groups.

Key words: *influenza, morbidity, polymerase chain reaction, IFA, genetic analysis*

Грипп – инфекция, известная со времен Гиппократа (V век до н. э.), которая не имеет себе равных по скорости глобального распространения. Некоторые субтипы возбудителя, в частности А(H5N1), отнесены к особо опасным в связи с высокой (около 60%) летальностью заболевших. Этот вирус пока не приобрел свойственной вирусам гриппа способности к трансмиссии среди людей, поскольку имеет прямое происхождение от вируса H5N1 птиц, но оказался способным преодолевать барьер хозяина и при тесном контакте инфицировать человека [12]. В последнее время в двух лабораториях США и Нидерландов показана возможность приобретения такого свойства в результате последовательного пассирования вируса H5N1 на лабораторных животных (хорьках) или реассортации генов вирусов гриппа А(H5N1) и А(H1N1) [11]. С учетом важности проблемы гриппа по инициативе акад. А. А. Смородинцева в России в марте 1967 г. был организован ВНИИ гриппа,

одним из основных направлений деятельности которого был определен надзор за гриппом и ОРВИ в стране [7]. Быстро и четко организованная деятельность института при поддержке со стороны Министерства здравоохранения СССР привела к его признанию на международном уровне и созданию на базе института Национального центра по гриппу (НЦГ), признанного ВОЗ в 1971 г. одним из участников Глобальной сети надзора за гриппом (GISN). Важный вклад в это направление деятельности в свое время внесли проф. Т. Я. Лузянина и сотр., проф. Ю. Г. Иванников и сотр., затем его продолжили акад. О. И. Киселев, проф. А. А. Соминина, канд. мед. наук Л. Е. Камфорин, д-р мед. наук И. Г. Маринич, в настоящее время оно развивается с привлечением современных методов молекулярной диагностики, антигенного и филогенетического анализа, что дает ценную информацию для понимания эволюции возбудителей гриппа и позволяет контроли-

Контактная информация:

Соминина Анна Адольфовна, д-р мед. наук, проф., зав. каф.; e-mail: anna@influenza.spb.ru

ровать появление мутаций, ответственных за признак высокой патогенности для человека.

Существующая в настоящее время в России система надзора за гриппом среди людей базируется в основном на деятельности двух НЦГ ВОЗ, функционирующих на базе ФГБУ НИИ гриппа и НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, получивших в 2011 г. подтверждение ВОЗ с указанием на “важный вклад в работу по профилактике и борьбе с гриппом признанного ВОЗ Национального центра по гриппу в РФ”. Деятельность НЦГ при НИИ гриппа основана на взаимодействии с 49 опорными базами (ОБ) в составе ФБУ Центры гигиены и эпидемиологии, расположенными в различных регионах РФ [4]. Ежегодно в непрерывном режиме НЦГ осуществляет надзор за гриппом и другими ОРВИ, что отражается в еженедельной аналитической информации, размещаемой на сайте НИИ гриппа [5], и представляемой в Минздравсоцразвития России, глобальные системы ВОЗ FluNet и EuroFlu [1, 9] и обратно в ОБ. Именно в НЦГ были идентифицированы первые случаи заноса пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в Москву (май 2009 г.) и Санкт-Петербург (июнь 2009 г.). После первой волны заболеваемости в Мексике, США и Канаде за короткий промежуток времени (май–июнь) вирус получил глобальное распространение и осенью 2009 г. вызвал развитие пандемии в разных странах мира. Посвященные этому работы широко опубликованы [2, 3, 8, 10, 13]. Настоящая работа посвящена анализу последовавшего за пандемией эпидемического сезона 2010–2011 гг. по материалам НИИ гриппа, проведенному с привлечением современных методов исследования, что отражает прогресс, достигнутый в последние годы в области надзора за гриппом. Эти исследования представляли серьезный научный и практический интерес с точки зрения раскрытия закономерностей развития постпандемических событий, вызванных вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09. К началу сезона было неясно, как поведет себя вирус, вытеснит ли он возбудителей сезонного гриппа А, изменятся ли его антигенные, генетические свойства и важнейшие биологические признаки, такие как патогенность для человека и чувствительность к противовирусным препаратам.

Материалы и методы

Лабораторный надзор. Лабораторный надзор за гриппом осуществлялся в соответствии с нормативными [4] и методическими документами [6].

Выделение вируса гриппа в ОБ проводили в клеточной культуре MDCK, полученной из Центра CDC (Атланта, США) и переданной из института, а в НЦГ – одновременно в двух системах (куриные эмбрионы и клетки MDCK). Для типирования возбудителей в ОБ использовали специфические диагностические кроличьи сыворотки (ООО “Предприятие по производству диагностических препаратов”). Антигенный анализ выделенных возбудителей осуществляли в НЦГ в РТГА с использованием крысиных сывороток к референс-штаммам вирусов гриппа, а также сывороток из набора для идентификации вирусов гриппа, полученного из CDC по линии ВОЗ. В работе использовали референс-вирусы А/Калифорния/07/09 (Н1N1)pdm09, А/swIowa/15/30(Нsw1N1), А/Южная Каролина/20/10 (Н1N1)pdm09, А/Брисбен/10/07(Н3N2), А/Висконсин/15/09(Н3N2), А/Перт/16/09(Н3N2), А/Виктория/208/

09(Н3N2), А/Род-Айленд/1/10(Н3N2), В/Малайзия/2506/04, В/Брисбен/60/08 и российские изоляты.

Контроль популяционного иммунитета. Анализ популяционного иммунитета осуществляли в ОБ путем исследования в РТГА сывороток от 100 взрослых здоровых доноров крови с определением процента серопозитивных лиц и среднегеометрических титров (СГТ) антител у населения различных городов страны. Определение проводили дважды в год: в предэпидемический (октябрь) и постэпидемический (апрель) периоды.

Генетический анализ. Для первичного скрининга клинических образцов использовали ПЦР-тест-системы “АмплиСенс” (ЦНИИ эпидемиологии, Москва), а также праймеры и контрольные образцы для типирования и субтипирования вирусов гриппа А и В, любезно предоставленные специалистами CDC (Атланта, США). Определение нуклеотидной последовательности молекулы HA1 было проведено с использованием ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США). BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 был использован для анализа последовательностей. С помощью программы Vector NTI 8 и MEGA 2.1 предсказывали первичные аминокислотные последовательности гемагглютинина, нейраминидазы и М2-белка. При построении филогенетических древ были использованы также нуклеотидные и аминокислотные последовательности гемагглютинина, нейраминидазы и М2-белка, представленные в Международной базе данных GenBank.

Эпидемиологический надзор осуществляли на основании сообщений из 49 ОБ в соответствии с приказом Роспотребнадзора [4].

Результаты и обсуждение

Популяционный иммунитет. За предшествующий пандемический сезон (2009–2010) в России переболело около 8,5% населения, вакцинировано сезонной тривакциной 34,4 млн человек, вакциной против пандемического гриппа – около 29 млн человек. В итоге процент серопозитивных лиц к вирусу гриппа А(Н1N1)pdm09 повысился с 3,1 в октябре 2009 г. до 36,2 в октябре 2010 г. Вместе с тем около 63,8% здорового взрослого населения оставалось неиммунным по отношению к пандемическому вирусу гриппа и около 29,6 и 26,5% людей не имели защитных титров антител к вирусам гриппа А(Н3N2) и В, что позволяло ожидать развития эпидемии смешанной этиологии с участием вирусов А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В.

Мониторинг гриппа и ОРВИ. За анализируемый период в 46 ОБ методом ПЦР было обследовано 49 934 больных гриппом и другими ОРВИ, методом ИФ – 35 726 больных. После осеннего подъема заболеваемости в сентябре–октябре 2010 г., связанного с усилением циркуляции возбудителей ОРВИ негриппозной этиологии, среди которых более чем в 20% случаев выявляли вирусы парагриппа, РСВ и аденовирусы, в начале сезона 2010–2011 гг. методом ПЦР еще регистрировали единичные случаи сезонного гриппа А(Н1N1), однако в последующий период этот возбудитель больше не обнаруживали. Вирус гриппа А(Н3N2), однако, продолжал циркулировать среди населения начиная с конца ноября 2010 г. В декабре частота его регистрации возросла до 4,6–5,7%, но интенсивность циркуляции на протяжении всего последующего периода носила умеренный характер. Напротив, активность

вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в прошедшем сезоне была весьма высокой. Рост частоты регистрации заболеваний, вызванных этим возбудителем, наметился в конце декабря. В январе 2011 г. по результатам ПЦР она достигла 18,2–27%, а в феврале – 33,8–35,6% с сохранением активности до конца марта в пределах 19,5–36% от числа обследованных, хотя по результатам ИФ в марте она снизилась до 2,2–7,6%, что лучше коррелировало с данными о снижении заболеваемости. Вирусы гриппа В появились в самом начале сезона, но диагностировались в небольшом (0,2–1,9) проценте случаев до начала зимы. В декабре интенсивность их циркуляции повысилась (до 2,8–5,9% по результатам ПЦР и 2,1–3,4% по результатам ИФ) и достигла максимума в январе (до 8,9–21,3 и 7,4–7,5% по результатам ПЦР и ИФ) с последующим постепенным снижением в феврале–апреле. В марте–июне в ОБ регистрировали единичные случаи гриппа А(Н1N1)pdm09 и В. Интеграция данных лабораторной диагностики и эпидемиологических показателей показала, что первая волна подъема заболеваемости, зарегистрированная в ряде городов России, начиная с 47–49-й недели, была связана с присоединением вирусов гриппа А(Н3N2) и В к активно циркулировавшим в этот период аденовирусам и вирусам парагриппа. Второй, более выраженный, эпидемический рост заболеваемости в январе–феврале был обусловлен преимущественной циркуляцией пандемического вируса А(Н1N1)pdm09 при социркуляции вирусов гриппа В и в меньшей степени – А(Н3N2). По сравнению с пандемическим сезоном (2009–2010) заболеваемость за последний сезон в целом несколько снизилась (с 8,5 до 6,6% от численности населения), как и показатели госпитализации (с 2,6 до 23% от числа заболевших ОРВИ). Количество летальных исходов, в 95,7% случаев, обусловленных вирусом А(Н1N1)pdm09, уменьшилось в 2010–2011 гг. по сравнению с пандемией 2009–2010 гг. с 634 до 232 случаев (по данным ОБ). Следует отметить, что в структуре заболеваемости ОРВИ достаточно высокой была роль возбудителей ОРВИ: по результатам ИФ в целом за сезон частота детекции вирусов парагриппа составила 9,4%, аденовирусов – 5,7%, РСВ – 2,9%, а по результатам ПЦР – 4,2, 4 и 1,5% случаев от числа обследованных больных соответственно. Циркуляция вирусов парагриппа, РСВ и аденовирусов снизилась в период эпидемии, но вновь возросла в постпандемический период.

Выделение вирусов гриппа было проведено в 27 ОБ, исследованы

материалы от 9565 больных. За весь сезон был выделен 561 вирус гриппа, в том числе 297 штаммов А(Н1N1)pdm09, 18 штаммов А(Н3N2) и 246 вирусов гриппа В.

Наиболее эффективной (частота выделения 11,9–25,6%) была работа вирусологов ОБ в Астрахани, Воронеже, Калининграде, Краснодаре, Москве, Новосибирске и Туле. Первые вирусы гриппа В были выделены в Новосибирске (на 50-й неделе), гриппа А(Н3N2) – в Чите (на 51-й неделе), вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 – в Астрахани (на 4-й неделе 2011 г.). Частота выделения вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В за неделю на пике в целом по стране составила 10, 2,3 и 7,5% соответственно, т. е. была ближе к данным ИФ-анализа в тот же период (14,4, 2,2 и 7,5% соответственно), чем к данным ПЦР (36, 5,7 и 21,3% соответственно) (рис. 1). По данным се-

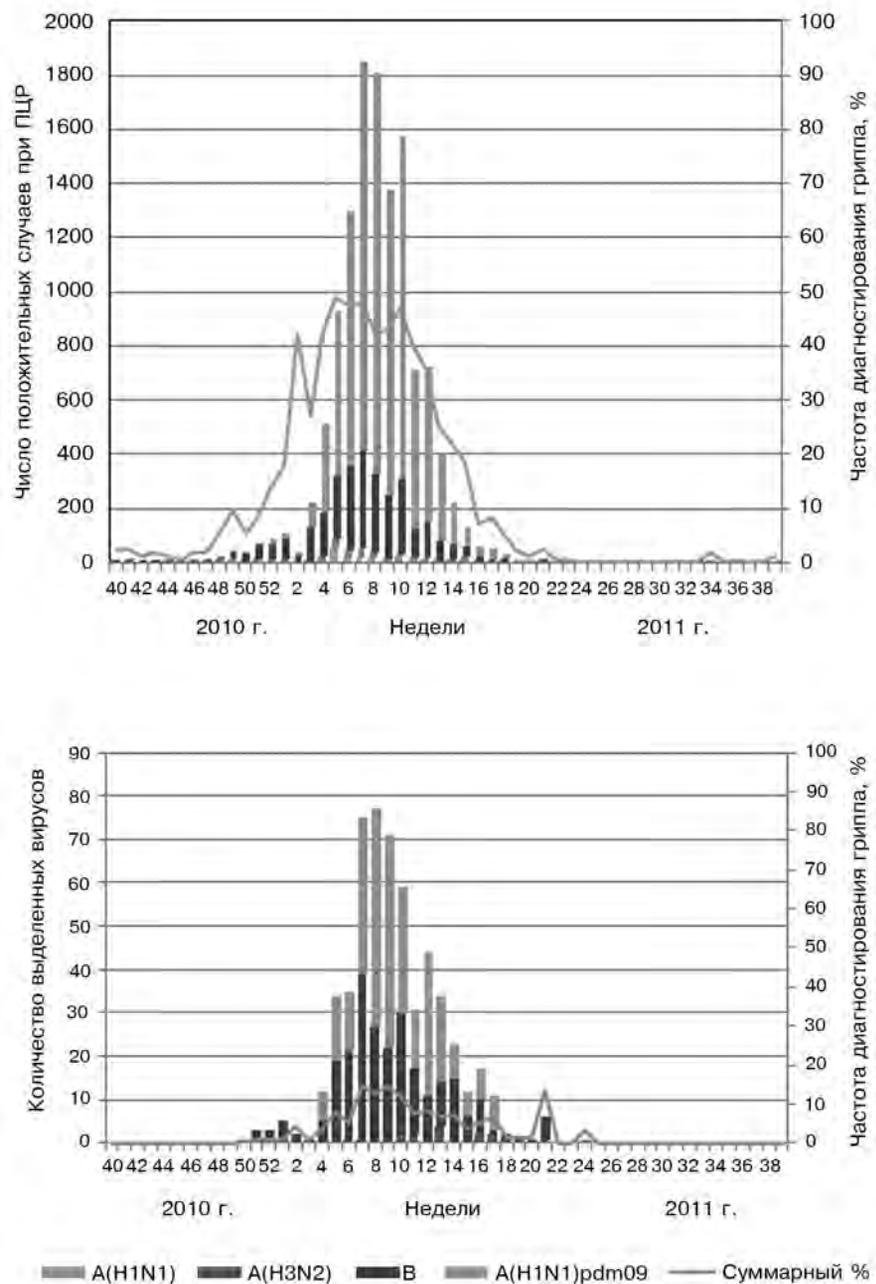


Рис. 1. Результаты ПЦР-диагностики и выделения вирусов гриппа в сезон 2010–2011 гг. в России.

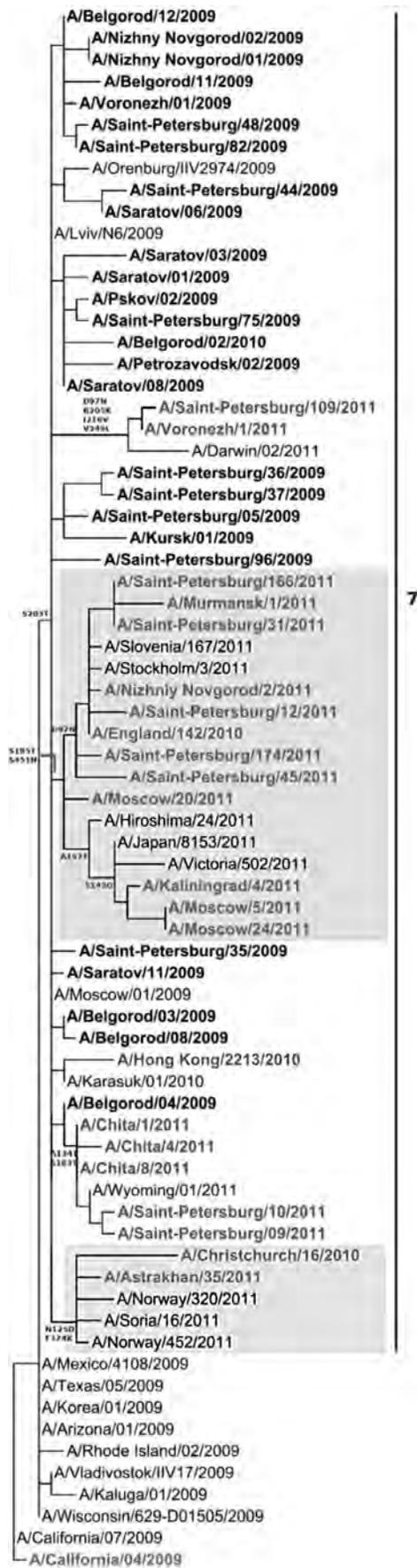


Рис. 2. Филогенетическое древо по гену гемагглютина вируса гриппа А подтипа H1N1pdm09, построено методом максимального правдоподобия (ML), эволюционная модель НКУ+I+G.

рологической диагностики частота выявления гриппа А(H1N1)pdm09, А(H3N2) и В в период эпидемии составила 11,4, 8,2 и 12,5% соответственно.

Антигенный анализ выделенных вирусов. За эпидемический сезон 2010–2011 гг. в НИИ гриппа было исследовано 489 новых изолятов вируса гриппа, из них 279 штаммов было получено из ОБ, 210 вирусов было выделено непосредственно в НЦГ. В общем числе выделенных штаммов преобладали вирусы гриппа А(H1N1)pdm09 (54,2% от числа выделенных) и гриппа В (43,4%), вирусы гриппа А(H3N2) составили лишь 2,4% от общего числа

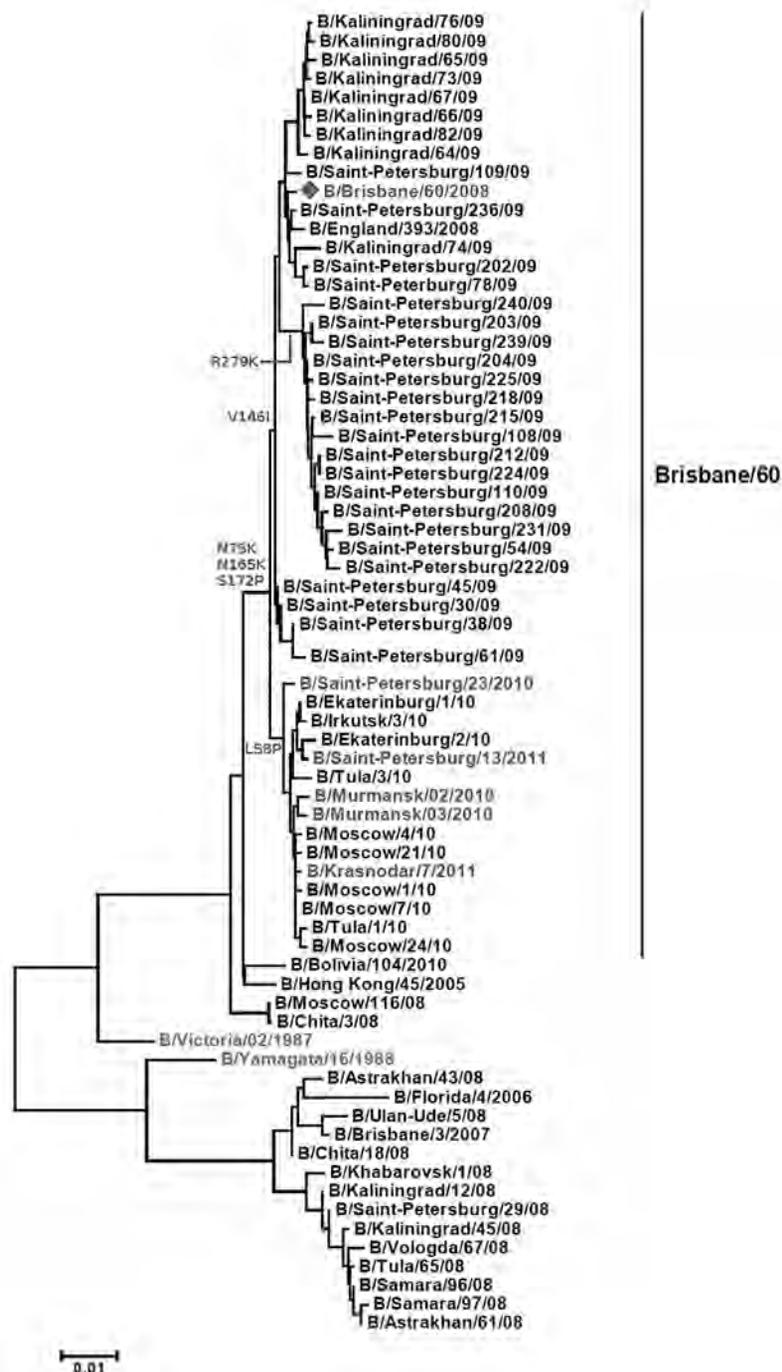


Рис. 3. Филогенетическое древо по гену гемагглютинаина вирусов гриппа В, построено методом ближайших соседей (NJ), эволюционная модель Кимуры (K80).

изолятов. Большая часть (более 90%) вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 сезона 2010–2011 гг. активно реагировала с сыворотками против референс-штаммов А/Калифорния/07/09 и А/Ю.Каролина/20/10 (до 1–1/2 гомологичного титра), что свидетельствовало об их антигенной однородности. Вместе с тем были выявлены и дрейф-варианты вируса, такие как А/С.Петербург/109/11 и А/Астрахань/1/11, реагирующие с антисыворотками к вирусу А/Ю.Каролина/20/10 лишь до 1/8 титра. Исследованные вирусы гриппа А(Н3N2) по антигенным характеристикам относились к варианту А/Перт/16/09, но были ближе к вирусам подгруппы А/Виктория/208/09. Все вирусы гриппа В, выделенные в ОБ НЦГ, относились к Викторианской линии и оказались антигенно близкородственными референс-штамму В/Брисбен/60/08.

Молекулярно-генетическая характеристика вирусов гриппа. В период эпидемии в НЦГ методом ПЦР проведен анализ 957 клинических и 189 секционных образцов. В образцах от 307 (32%) больных были обнаружены возбудители гриппа, в том числе в 19,2% вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, в 12,2% вируса гриппа В, в 0,5% – гриппа А(Н3N2). В поступивших в НЦГ для исследования секционных материалах в 52 (27,5%) случаях было подтверждено наличие РНК исключительно вируса гриппа А(Н1N1)pdm09.

Популяция штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 была генетически разнообразной, хотя все исследованные штаммы оказались эволюционно связанными с доминирующим в мире клейдом 7. Вместе с тем среди вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, депонированных в музей НИИ гриппа, были обнаружены штаммы, подобные референс-вирусу А/Darwin/02/2011, содержащие замены D97N, R205K, I216V, V249L, штамму А/England/142/2011, содержащие замены D97N, S185T, S451N, вирусу А/Wyoming/01/2011, содержащие замены A134T, S183P, и штамму А/Christchurch/16/2010, содержащие замены N125D, E374K (рис. 2). Наиболее продвинутые варианты вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09, такие как А/Астрахань/1/2011, А/Санкт-Петербург/27/11, А/Санкт-Петербург/100/11, были определены по решению ЕвроВОЗ и СЦ ВОЗ в Лондоне как родоначальники новых генетических групп (5, 6 и 7) возбудителя [1]. Штаммы вируса гриппа А(Н3N2) по генетическим характеристикам относились к группе вирусов, подобных референс-штамму А/HongKong/2121/2010 с характерными для этого клейда заменами D53N, Y94N, I230V, E280A. Все проанализированные штаммы А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) не имели в нейраминидазе мутацию H275Y, определяющую устойчивость к озельтамивиру, но несли мутацию S31N в молекуле М-белка, ответственную за устойчивость к ремантадину.

Исследованные вирусы гриппа В относились к Викторианской линии, клейду III-ii, с характерными аминокислотными заменами (V146I, N165K) в гемагглютинине, затрагивающими антигенные сайты (петли 150 и 160). Данные штаммы отличались от вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 двумя аминокислотными заменами в гене гемагглютинина: в позиции 58 – остатка лейцина на остаток пролина и в позиции 146 – остатка изолейцина на остаток валина, а в гене нейраминидазы имели замены T45I, S51P, F73L, D199N, I455L (рис. 3).

Полученные данные свидетельствовали о вытеснении из циркуляции в 2010–2011 гг. сезонного вируса

гриппа А(Н1N1) получившим широкое распространение вирусом А(Н1N1)pdm09, что позволило исключить его из состава вакцин.

Выявленные закономерности в циркуляции вирусов гриппа были сходны по результатам использования различных методов исследований, хотя частота обнаружения вирусов, особенно пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, была значительно выше в ПЦР, чем при других методах исследования (серология, выделение вирусов и ИФА). В структуре заболеваний гриппозной этиологии ведущим возбудителем был вирус пандемического гриппа, вторым по значимости был вирус гриппа В, тогда как участие вируса гриппа А(Н3N2) было незначительным и в основном ограничивалось регионами Дальнего Востока и Сибири. По результатам антигенного анализа большая часть выделенных за сезон 2010–2011 гг. в России вирусов, как и в других странах Европы, оказалась родственной штаммам, введенным в состав вакцин на 2011–2012 гг. Как показал генетический анализ, в сезоне 2010–2011 гг. в России появились наиболее продвинутые дрейф-варианты вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, такие как А/Астрахань/1/2011 (замены в HA1 – D97N, R205K, I216V, V249L), А/Санкт-Петербург/27/11 (D97N, S185T), А/Санкт-Петербург/100/11 (D97N, S143G, S185T, A197T), явившиеся представителями новых (5, 6 и 7) генетических групп возбудителя (J. McCauley и соавт., СЦ ВОЗ, Лондон), которые затем были выделены и в других странах Европы [1, 14]. Вместе с тем сохраняется настоятельная необходимость более пристального внимания к развитию исследований по более раннему выделению сезонных вирусов гриппа в ОБ, а также быстрому распознаванию новых вариантов вирусов гриппа с пандемическими потенциалами (субтипов H2, H5, H7, H9), способных вызывать заболевания у людей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еженедельный бюллетень Euro Flu. <http://www.euroflu.org/бюллетень>.
2. Киселев О. И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1-2009. М.: «Димитрейд График Групп»; 2011.
3. Львов Д. К., Бурцева Е. И., Приштов А. Г. и др. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009) первого штамма А/HV-Moscow/01/2009 от больного в Москве. Вопросы вирусологии. 2009; 5: 10–4.
4. Приказ Роспотребнадзора от 31.03.2005 № 373. О совершенствовании системы эпидемиологического надзора и контроля за гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями. М.; 2005.
5. Сайт ФГБУ НИИ гриппа. <http://www.influenza.spb.ru>.
6. Сборник методических рекомендаций по выделению вирусов, ИФ, ПЦР-диагностике гриппа и вводу данных сигнального надзора в системе on-line. СПб.; 2011. 67 с.
7. Смородицев А. А. Основные направления научной работы ВНИИ гриппа МЗ СССР по профилактике гриппа и ОРЗ. В кн.: Сборник научных работ ВНИИ гриппа МЗ СССР. Л.; 1969: 3–15.
8. Сомнина А. А., Грудинин М. П., Еропкин М. Ю. и др. Анализ пандемии гриппа в России как части глобального процесса по материалам референс-центра по мониторингу гриппа. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011; 3: 20–6.
9. FluNet: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/fluNet/en/index.
10. Fraser C., Donnelly C. A., Cauchemez S. et al. Pandemic potential of a strain of influenza A(H1N1): early findings. Science. 2009; 324: 1557–61.
11. Report of technical consultation on H5N1 research issues. Geneva, 16–17 February, 2012.
12. Update on human cases of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection, 2010. Wkly Epidemiol. Rec. 2011; 86 (17): 161–6.
13. Update: Novel influenza A(H1N1) virus infections – worldwide, May 6, 2009. Morbid. Mortal. Wkly Rep. 2009; 58 (17): 453–7.
14. WHO Influenza Centre, London. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere, 20–22 February 2012: 1–73.

Поступила 31.05.12