

М. П. Грудинин, А. Б. Комиссаров, М. М. Писарева, М. А. Стукова, Ж. В. Бузицкая, А. А. Паянкова,
Е. А. Елпаева, А. В. Задонская, Я. В. Иванов, О. И. Киселев

Генетическое разнообразие и молекулярная эволюция вирусов гриппа А в России в 2006–2012 гг.

ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

В работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа более 280 штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, циркулировавших на территории России в 2006–2012 гг. Проанализированы генетические изменения, лежащие в основе эволюции вирусов и чувствительности штаммов к противовирусным препаратам. Показано, что за изученный период произошли существенные изменения в генетической структуре циркулирующих на территории РФ вирусов гриппа А и их филогенетической принадлежности. Для анализа антигенного дрейфа и направления эволюционной изменчивости вирусов гриппа продемонстрирована целесообразность проведения исследований по выявлению кодонов, находящихся под действием положительного отбора *in silico* в генах, кодирующих поверхностные белки вируса гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа А, молекулярная эволюция, филогенетический анализ

Genetic Diversity and Molecular Evolution of the Influenza A Viruses in Russia during 2006-2012

M. P. Grudin, A. B. Komissarov, M. M. Pisareva, M. A. Stukova, J. V. Buzitskaya, A. A. Payankova,
E. A. Elpaeva, A. V. Zadonskaya, Y. V. Ivanov, and O. I. Kiselev

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

The results of molecular genetic analysis of more than 280 strains of influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 circulating in Russia in 2006-2012 are presented. The genetic changes underlying the evolution of the virus strains and sensitivity to antiviral drugs were analyzed. Significant changes in the genetic structure of influenza A viruses circulating in the Russian Federation and their phylogenetic affiliation are shown to occur within the studied period. The studies identifying codons under the positive selection *in silico* in the genes encoding surface proteins of the influenza virus were demonstrated to be efficient for the analysis of the antigenic drift and direction of evolutionary variability of the influenza viruses.

Key words: Influenza virus A, molecular evolution, phylogenetic analyses

Грипп является заболеванием, вызываемым вирусом, постоянная эволюция которого приводит к непрекращающимся ежегодным эпидемиям. В основе эволюции вирусов гриппа лежит накопление мутаций, вызывающих антигенный дрейф и возникновение новых вариантов вируса, что обеспечивает гетерогенность вирусной популяции и лежит в основе формирования различных генетических линий [8]. На протяжении последних десятилетий отмечается динамическое преобладание определенных филогенетических линий вирусов гриппа, связанное с их географическим распространением. Особенности генетической структуры позволяют вирусу гриппа эволюционировать путем реассортации геномных сегментов различных штаммов [13]. Появление в 2009 г. нового пандемического штамма вируса гриппа А H1N1pdm2009 подтвердило потенциал эволюционных возможностей вируса гриппа. Настоящая работа посвящена молекулярной эволюции вирусов гриппа А, циркулировавших в России начиная с 2006 г.

Материалы и методы

В работе использовали более 280 штаммов вирусов гриппа А, выделенных из клинического материала (мазки из носоглотки и зева, бронхоальвеолярный

лаваж, секционный материал) в лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России.

Секвенирование. Выделение РНК проводили с использованием коммерческих наборов RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия). Обратную транскрипцию РНК выполняли с помощью набора Реверта-Л («Интерлаб-сервис», Россия). Амплификацию кДНК осуществляли стандартным методом с использованием оригинальных праймеров. Секвенирование фрагментов генома вирусов гриппа А (генов HA, NA, M, NS и NP) проводили на приборе ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1.

Филогенетический анализ. Обработку и анализ последовательностей осуществляли с помощью программы Vector NTI v10.1.1 («Invitrogen») и MEGA 5 (PSU, США). Для построения филогенетических древ использовали метод максимального правдоподобия (ML). Выбор эволюционной модели осуществляли по значению критерия Акаике (AIC) с помощью программы ModelTest v3.7 [12]. Для поиска сайтов положительной селекции использовали алгоритм SLAC [7].

Контактная информация:

Писарева Мария Михайловна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб.; e-mail: pisareva@influenza.spb.ru

Результаты и обсуждение

С целью изучения генетического разнообразия и особенностей молекулярной структуры вирусов гриппа А, циркулирующих на территории Российской Федерации в эпидемические сезоны 2006–2012 гг., нами была проанализирована охарактеризованная по антигенным свойствам репрезентативная выборка штаммов вирусов гриппа А.

Вирус гриппа А подтипа H1N1. В 2006–2007 гг. в России циркулировали вирусы гриппа А подтипа H1N1, относящиеся к двум генетическим группам – клейдам 1 и 2. Штаммы, относящиеся к клейду 1, были подобны вакцинному штамму А/Новая Каледония/20/1999 (рис. 1). Вирусы, содержащие характерные замены T82K, Y94H, R145K, R208K, R225K в гемагглютинине (НА) и V234M, D382N в нейраминидазе (НА), являлись эволюционным продолжением вирусов клейды 1 и формировали генетически гетерогенные группы вирусов клейды 2. На территории РФ в этот период практически не отмечена циркуляция вирусов гриппа А клейды 2А, подобных вакцинному штамму А/Соломоновы Острова/3/06. Вирусы, циркулировавшие в России в этот период, образовывали обособленную группу и явились предшественниками вирусов клейды 2С, появившихся в 2007 г., с характерными заменами S36N, A189T в НА и S82K, M188I в НА. В 2007 г. на территории РФ была отмечена незначительная циркуляция вирусов гриппа А (H1N1), подобных штамму А/Брисбен/59/07 (клейда 2В).

В эпидемический сезон 2008–2009 гг. в России грипп был вызван преимущественно вирусами, близкими к вакцинному штамму А/Брисбен/59/2007, относящимися к клейду 2В. Преобладание вирусов клейды 2В среди вирусов гриппа А (H1N1) было характерно не только для России, но и для всего мира [6]. Среди исследованных нами штаммов выделенных на Дальнем Востоке и в Сибири, были также обнаружены представители клейды 2С (А/Владивосток/83/08, А/Хабаровск/3/09, А/Новосибирск/9/09 и др.), которые интенсивно циркулировали в Азиатско-Тихоокеанском регионе [6].

Нами было показано, что для НА российских представителей клейды 2В характерно наличие мутаций D35N, R188K, K145R, а для

представителей клейды 2С – мутаций S36N, K82R, R145K, R188M, A189T и T193K. Различия в антигенной структуре представителей этих двух клейд, по-видимому, обусловлены мутациями в антигенных сайтах Ca₂ (K145R), Сb (K82R) и Sb (T193K). Штаммы клейды 2В 2008–2009гг. отличались от вы-

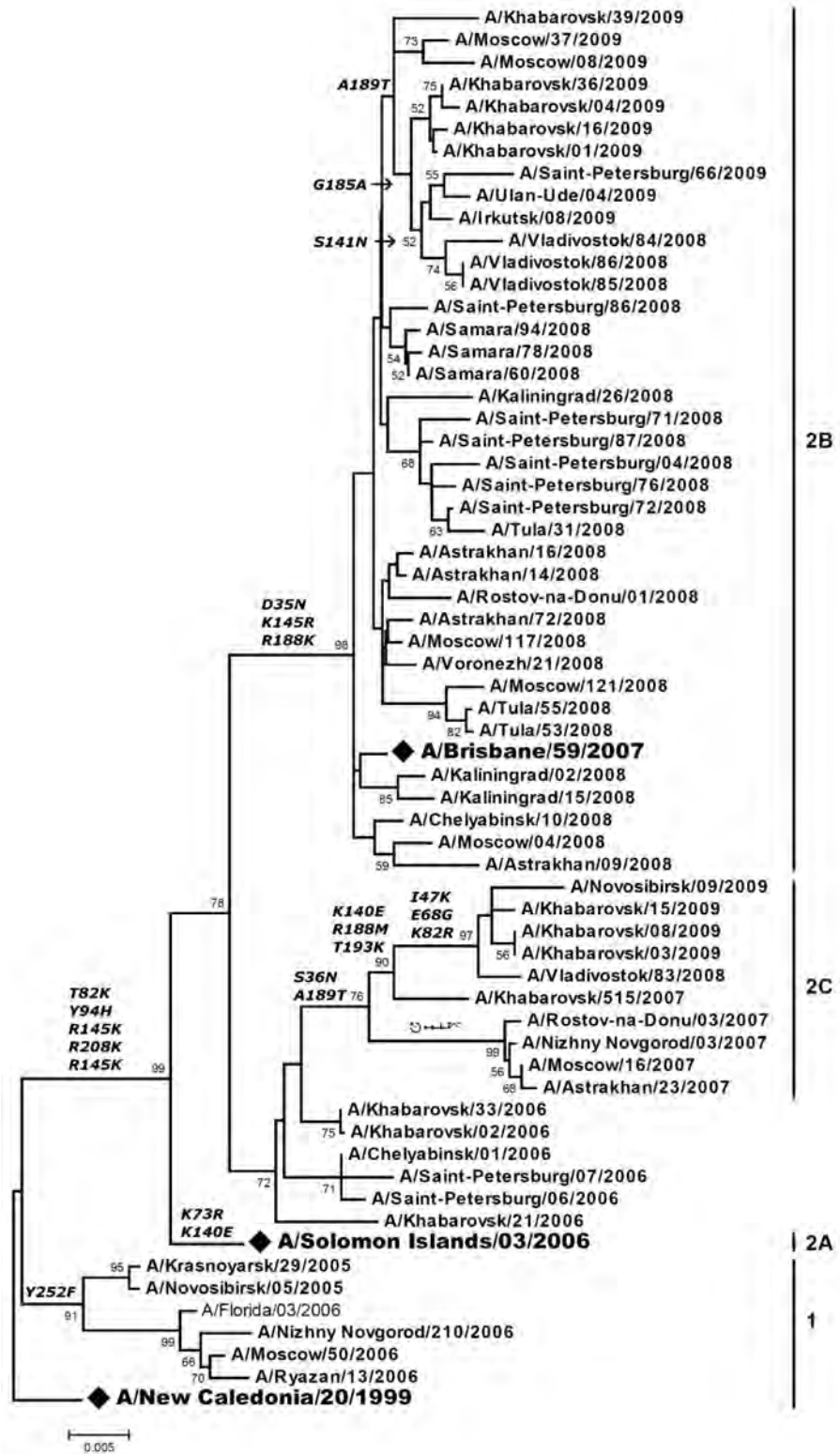


Рис. 1. Филогенетическое древо по гену гемагглютинина вируса гриппа А подтипа H1N1.

Здесь и на рис. 2 и 3: древо построено методом максимального правдоподобия (ML), эволюционная модель GTR+G. Бутстреп-анализ 1000 репликаций. Знаком ♦ отмечены вакцинные штаммы.

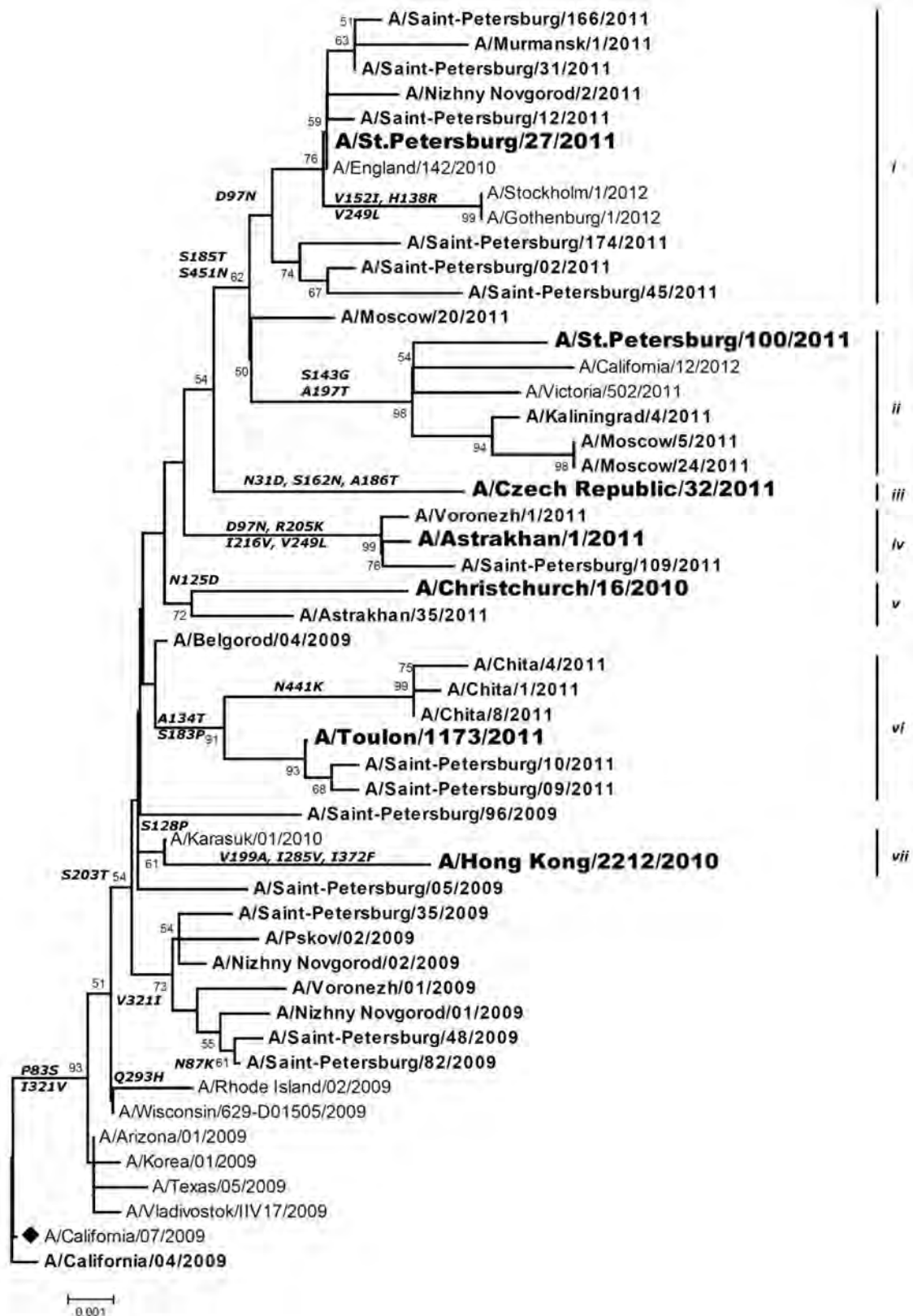


Рис. 2. Филогенетическое древо по гену гемагглютинаина вируса гриппа А подтипа H1N1pdm2009. Жирным шрифтом отмечены референс-штаммы генетических групп (i-vii).

деленных ранее представителей этой клады заменой A189T.

В последовательности HA представителей клады 2В нами было выявлено 2 кодона, находящихся (с вероятностью более 95%) под действием положитель-

ного отбора (кодоны 186 и 227). По данным рентгеноструктурного анализа остаток 186 входит в состав рецепторсвязывающего сайта HA (спираль 190), предположительно участвуя в образовании водородной связи с сиалопентасахаридом [9, 14].

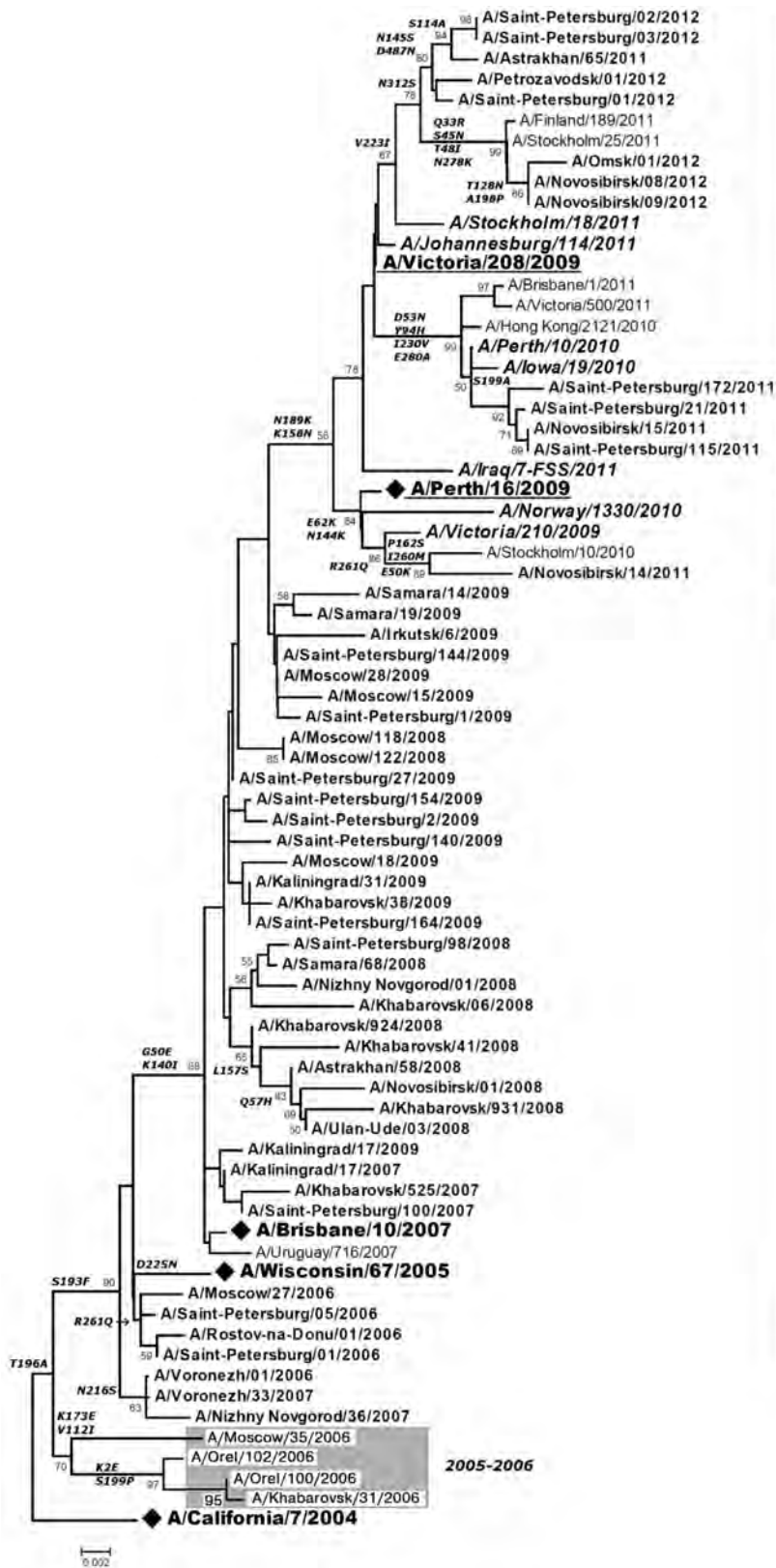


Рис. 3. Филогенетическое древо по гену гемагглютинина вируса гриппа А подтипа H3N2.

i-iv – генетические группы.

Для последовательностей NA штаммов клады 2В характерны мутации G249K и T287I, а для штаммов клады 2С – мутации M188I, I267M, L367I. Мутации M188I, G249K, T287I и L367I расположены в так называемых филогенетически значимых областях D, F, H и L соот-

ветственно. Известно, что область L в N1 является антигенным сайтом [4]. Большая часть последовательностей N1 штаммов клады 2В имели мутацию устойчивости к озельтамивиру H275Y, однако имеющие эту мутацию штаммы не образовывали отдельную филогенетическую группу в пределах клады 2В. Среди представителей клады 2С устойчивые к озельтамивиру штаммы не выявлены.

Среди штаммов клады 2В не был обнаружен ни один штамм, имевший мутацию, определяющую устойчивость к ремантадину (S31N) в M2, в отличие от представителей клады 2С, устойчивых к этому препарату.

Исследованные представители клады 2С несли в последовательности белка M1 замену S207N, характерную для штаммов вируса гриппа А подтипа H5N1 цинхайской группы [Qinghai-like, например A/bar-headed goose/Qinghai/12/2005 (H5N1)]. Однако какова возможная роль данной замены в белке M1 вируса гриппа А (H1N1) человека, остается неясным. Известно, что мутации в С-концевом домене белка M1 могут возникать при адаптации вируса к мышам и связаны с повышением патогенности вирусов гриппа А [11].

Эпидемия гриппа А/H1N1pdm2009 в России началась в середине сентября 2009 г. и носила моноэтиологический характер. В эпидемическом сезоне 2010–2011 гг. вирусы гриппа А/H1N1pdm2009 также доминировали. Популяция штаммов была генетически однородна и эволюционно связана с пятью филогенетическими группами [15] доминирующей в мире клады 7 с характерной заменой S203T в HA (рис. 2). Все вирусы, кроме относящихся к кладе 1, содержали в HA замену P83S. Примечательно, что данные штаммы имели остаток валина в положении 321, которое находится вблизи сайта расщепления молекулы HA. Однако у значительного числа российских изолятов 2009 г. наблюдалась реверсия V321I в HA. У ряда штаммов 2009–2011 гг. были выявлены замены в антигенных сайтах Ca, Sb и Sa. Для выделенных в 2010–2011 гг. штаммов были характерны мутационные изменения, которые являлись следствием адаптации вируса к иммунизированной человеческой популяции. Значительные изменения в генетической структуре генов HA, NA, M, NS, NP данных штаммов выявлены не были [1]. Ни один из штаммов не имел мутации устойчивости к озельтамивиру H275Y, но все штаммы несли мутацию устойчивости к ремантадину S31N в M2. В рецепторсвязывающем сайте HA большинства штам-

мов (82%), выделенных от умерших, обнаруживали замену D222G, приводящую к расширению рецепторной специфичности.

Проведенный анализ сайтов, подверженных положительной селекции, выявил 3 кодона в последовательности HA вируса гриппа A/H1N1pdm2009 – 239, 289 и 391. Мутации в положении 222 HA1 (кодон 239) влияют на рецепторную специфичность. Кодон 391 (положение 47 в HA2) находится в районе эпитопа CR6261, который распознается одноименным антителом. Нейтрализующее действие этого антитела на конформационные перестройки связано со слиянием мембран [3]. В работах по молекулярному моделированию показано, что мутация E391K теоретически должна способствовать усилению взаимодействия между субъединицами HA, ослабляя внутрисубъединичные взаимодействия [10].

Вирусы гриппа подтипа H3N2 эпидемиологического сезона 2006–2007 гг. отличались значительным генетическим разнообразием (рис. 3). С одной стороны, циркулировали вирусы, подобные штамму A/Висконсин/67/2005, которые имели ряд замен в HA (T128A, R142G, K173E). Замена T128A приводит к утрате потенциального сайта гликозилирования. Замены K173E, R142G были характерны для штаммов, выделенных в предыдущие годы (например, A/Йоханнесбург/33/99). Данные замены приводят к смене заряда аминокислотного остатка. У ряда вирусов из этой группы была выявлена замена L157S в антигенном сайте B1, замена N145KJ в сайте A и замена D188E в сайте B2. Также была отмечена циркуляция вирусов, содержащих замену S193F в антигенном сайте B2, N216S в сайте D, и вирусов, содержащих замены V112I и K173E. Еще одну группу составили штаммы, подобные штамму A/Брисбен/10/07, рекомендованному ВОЗ для производства вакцин на 2008 г. и имеющие новые существенные замены G50E и K140I.

Вирусы гриппа А подтипа H3N2 эпидемиологических сезонов 2007–2009 гг. были генетически родственны вакцинному штамму A/Брисбен/10/2007 (см. рис. 3). Для этих штаммов были характерны аминокислотные замены G50E в антигенном сайте С и K140I в сайте А последовательности HA; N93D, H150R и Y194I – в последовательности NA; последовательности белков M1 и M2 не несли специфические замены. Большинство проанализированных штаммов 2007 г. несли мутацию устойчивости к ремантадину (S31N) в белке M2. В пределах данной генетической клады по последовательностям генов HA и NA наблюдался небольшой отдельный кластер, состоявший из ряда московских изолятов (например A/Москва/118/2008). Для последовательностей HA этого кластера была характерна мутация K92R, для NA – две синонимичные мутации 351 A>G (в кодоне T117) и 408 G>A (в кодоне Q136). Практически все последовательности M1 штаммов 2008 г. имели мутацию K174R. Среди проанализированных штаммов не было выявлено ни одного, относящегося к новой филогенетической линии A/Перт/16-подобных штаммов. Таким образом, штаммы вируса гриппа А (H3N2) 2008–2009 гг. являлись эволюционным продолжением штаммов эпидемиологического сезона 2007–2008 гг.

Следует отметить, что в последовательностях NA вирусов гриппа А(H3N2)2008 г. и всех вирусов 2009 г. была обнаружена мутация D147N в сайте гликозилирования. Известно, что гликозилирование в по-

ложении 130 N1 (что соответствует 146 в N2) A/Висконсин/33 (H1N1) нарушает взаимодействие NA с плазминогеном и снижает патогенность вируса [5].

Подавляющее большинство исследованных штаммов вируса гриппа А подтипа H3N2 2008 г. несли в последовательности С-концевого домена белка M1 мутацию K174R, которая увеличивает склонность данного участка белковой цепи к образованию α -спирали [2]. Белок M2 всех изученных штаммов 2008 г. содержал мутацию устойчивости к ремантадину S31N.

В течение эпидемиологического сезона 2009–2010 гг. вирус гриппа А (H3N2) на территории России в эпидемиологическом процессе не участвовал, а в сезоне 2010–2011 гг. не имел эпидемиологического значения, единичные случаи выявления вирусов данного подтипа были отмечены в европейской части России, а в Сибири и на Дальнем Востоке вирус гриппа А (H3N2) проявлял слабую активность. Все вирусы, выделенные на востоке РФ, относились к генетической группе A/Виктория/210/2009/(R261Q) клады A/Перт/16/2009 (E62K, N144A). HA этих вирусов содержал ряд замен в антигенном сайте E2. Вирусы, циркулировавшие в европейской части РФ, относились к генетической группе A/Перт/10/2010 клады A/Виктория/208/2009 и имели замены в антигенном сайте С. Вес исследованные штаммы вируса гриппа А (H3N2) 2010–2011 гг. содержали в гене M мутацию, определяющую устойчивость к ремантадину (S31N).

Исследованные вирусы А (H3N2) эпидемиологического сезона 2011–2012 гг. относятся к генетической группе A/Стокгольм/18/2011 (V223I) клады A/Виктория/208/2009 и имеют аминокислотную замену N312S. Данные штаммы можно разделить на две подгруппы с характерными заменами N145S в антигенном сайте А, D487N и Q33R, S45N с возникновением потенциального сайта гликозилирования, T48I, N278K – в антигенном сайте С, T128N, A198P – в антигенном сайте B2 соответственно.

При анализе последовательностей NA штаммов вируса гриппа А (H3N2), циркулировавших в РФ в 2006–2012 гг., мутации устойчивости к озельтамивиру E119V не была обнаружена.

Таким образом, нами было изучено молекулярно-генетическое разнообразие вирусов гриппа А, циркулировавших в России в 2006–2012 гг. За этот период произошли существенные изменения генетической структуры циркулирующих на территории РФ вирусов гриппа, их чувствительности к противовирусным препаратам и филогенетической принадлежности. Кроме того, начиная с лета 2009 г. на территории России начал распространяться новый пандемический вирус гриппа А (H1N1pdm2009).

Для предсказания антигенного дрейфа и направления эволюционной изменчивости вирусов гриппа целесообразно проводить исследования по выявлению кодонов, находящихся под действием положительного отбора *in silico* в генах, кодирующих поверхностные белки вируса гриппа.

Непрерывный мониторинг мутационной изменчивости и филогенетический анализ циркулирующих штаммов играют важную роль в выборе вакцинных штаммов для специфической профилактики гриппа и противовирусных препаратов для его лечения. Филогенетический анализ является мощным инструментом выявления новых реассортантов, обладающих эпидемиологическим или пандемическим потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев О. И., Комиссаров А. Б., Стукова М. А., Бузицкая Ж. В., Писарева М. М., Елаева Е. А. и др. Пандемический грипп в России: диагностика и молекулярно-биологические характеристики вируса // Вопросы вирусологии. 2011; 56 (1): 17–21.
2. Anwar T., Lal S. K., Khan A. U. Matrix protein 1: A comparative in silico study on different strains of influenza A H5N1 virus. *Bioinformatics*. 2006; 1 (7): 253–56.
3. Ekiert D. C., Bhabha G., Elsliger M. A., Friesen R. H., Jongeneelen M., Throsby M. et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*. 2009; 324: 246–51.
4. Fanning T. G., Reid A. H., Taubenberger J. K. Influenza A virus neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus-host interactions. *Virology*. 2000; 276: 417–23.
5. Goto H., Wells K., Takada A., Kawaoka Y. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. *J. Virol.* 2001; 75: 9297–301.
6. Hay A. J., Daniels R., Lin Y. P., Zheng X., Hou T., Gregory V. et al. WHO influenza centre report. Sept. 2009. London; 2009: 1–31.
7. Kosakovsky Pond S. L., Frost S. D. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* 2005; 22 (5): 208–22.
8. Lin Y. P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res.* 2004; 103: 47–52.
9. Lin T., Wang G., Li A., Zhang Q., Wu C., Zhang R. et al. The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus. *Virology*. 2009; 392 (1): 73–81.
10. Maurer-Stroh S., Lee R. T., Eisenhaber F., Cui L., Phuap S. P., Lin R. T. A new common mutation in the hemagglutinin of the 2009 (H1N1) influenza A virus. *PLoS Curr.* 2010; 2: RRN1162.
11. McCullers J. A., Hoffmann E., Huber V. C., Nickerson A. D. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B virus confers mouse adaptation and virulence. *Virology*. 2005; 336: 318–26.
12. Posada D., Crandall K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998; 14: 817–8.
13. Scholtissek C., Burger H., Bachmann P. A., Hannoun C. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*. 1983; 129: 521–33.
14. Skehel J. J., Wiley D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69: 531–69.
15. Summary of NIMR Results. Final Report for WHO meeting: 20–22 February 2012. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2012.pdf>.

Поступила 31.05.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 578.832.1:578.53].083.2

*М. В. Потапчук¹, И. А. Репко¹, М. В. Сергеева¹, А. В. Коротков¹, А. Б. Комиссаров¹, Н. Т. Сандыбаев²,
О. В. Червякова², Б. М. Хайруллин², Л. М. Цыбалова¹*

Характеристика реассортантных штаммов вируса гриппа на основе нового донора А/HongKong/1/68/162/35(H3N2)

¹ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург; ²РГП НИИ проблем биологической безопасности КН МОН, Казахстан

На основе нового универсального донора А/HongKong/1/68/162/35(H3N2) получены реассортантные штаммы, содержащие поверхностные антигены вируса гриппа различных субтипов А/СПБ/НК/09(H1N1), А/Astana/НГ/2009(H5N1), А/Otar/НК/2010(H3N8) и А/Perth/НК/2011(H3N2). Исследована репродуктивная активность, инфекционность и безвредность прототипов живой и инактивированной гриппозных вакцин, полученных на основе этих реассортантов. Показана возможность использования штамма А/HongKong/1/68/162/35(H3N2) в качестве универсального донора аттенуации и высокой репродуктивности.

Ключевые слова: вирус гриппа, реассортант, донор, живая гриппозная вакцина, инактивированная гриппозная вакцина

Characterization of Influenza Virus Reassortants Based on New Donor Strain А/НК/1/68/162/35(H3N2)

*M. V. Potapchuk¹, I. A. Repko¹, M. V. Sergeeva¹, A. V. Korotkov¹, A. B. Komissarov¹, N. T. Sandybayev²,
O. V. Chervyakova², B. M. Khairullin², and L. M. Tsybalova¹*

¹ Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia; ² Research Institute for Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan

Influenza reassortant viruses А/SPb/НК/09(H1N1), А/Astana/НГ/2009 (H5N1), А/Otar/НК/2010(H3N8), and А/Perth/НК/2011(H3N2), carrying surface antigens of different subtypes, were constructed on the basis of new potential unified donor strain А/НК/1/68/162/35(H3N2). The virulence and reproduction activity of the obtained reassortants were tested. The safety of the candidate live and inactivated influenza vaccines produced from the reassortant viruses was demonstrated. The study demonstrates that А/НК/1/68/162/35 can be used as a unified donor for attenuated and high-yield vaccine reassortants.

Key words: influenza virus, reassortant, donor, live attenuated vaccine, inactivated vaccine

Общими требованиями для вирусов гриппа А – доноров генов внутренних и неструктурных белков, используемых для получения реассортантных вакцинных и производственных штаммов (для живых и инактивированных гриппозных вакцин), являются безопасность

и иммуногенность. При получении вакцинных штаммов для живых гриппозных вакцин (ЖГВ) используются доноры аттенуации, обладающие двумя важными фенотипическими признаками – холодоадаптированностью (ca) и температурочувствительностью (ts). В

Контактная информация:

Потапчук Марина Валентиновна, ст. науч. сотр.; e-mail: mvpotapchuk@inbox.ru