

- C., Manuguerra J.C., Zeller H. Chikungunya outbreak in a rural area of Western Cameroon in 2006: a retrospective serological and entomological survey. *BMC Res. Notes*. 2010; 3: 128.
33. Dutta S.K., Pal T., Saha B., Mandal S., Tripathi A. Copy number variation of chikungunya ECSA virus with disease symptoms among Indian patients. *J. Med. Virol.* 2013; Oct. 16.
 34. Johnson D.F., Druce J.D., Chapman S., Swaminathan A., Wolf J., Richards J.S. et al. Chikungunya virus infection in travellers to Australia. *Med. J. Aust.* 2008; 188 (1): 41–3.
 35. Soon Y.Y., Junaidi I., Kumarasamy V., Chem Y.K., Juliana R., Chua K.B. Chikungunya virus of Central/East African genotype detected in Malaysia. *Med. J. Malaysia*. 2007; 62 (3): 214–7.
 36. Panning M., Grywna K., van Esbroeck M., Emmerich P., Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14 (3): 416–22.
 37. Lee N., Wong C.K., Lam W.Y., Wong A., Lim W., Lam C.W. et al. Chikungunya fever, Hong Kong. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12 (11): 1790–2.
 38. Mizuno Y., Kato Y., Kudo K., Takasaki T., Kurane I. First case of chikungunya fever in Japan with persistent arthralgia. *Kansenshogaku Zasshi*. 2007; 81 (5): 600–1.
 39. Rezza G., Nicoletti L., Angelini R., Romi R., Finarelli A.C., Panning M. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007; 370 (9602): 1840–6.
 40. Amador Prous C., López-Perezagua M.M., Arjona Zaragoza F.J., Martínez-Peinado C. Chikungunya fever in a Spanish traveller. *Med. Clin. (Barc.)*. 2007; 129 (3): 118–9.
 41. Cha G.W., Cho J.E., Lee E.J., Ju Y.R., Han M.G., Park C., Jeong Y.E. Travel-associated Chikungunya cases in South Korea during 2009–2010. *Osong Public Health Res. Perspect.* 2013; 4 (3): 170–5.
 42. Apandi Y., Lau S.K., Izmawati N., Amal N.M., Faudzi Y., Mansor W. et al. Identification of Chikungunya virus strains circulating in Kelantan, Malaysia in 2009. *South. Asian J. Trop. Med. Publ. Health*. 2010; 41 (6): 1374–80.
 43. Lim C.K., Nishibori T., Watanabe K., Ito M., Kotaki A., Tanaka K. et al. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81 (5): 865–8.
 44. Grandadam M., Caro V., Plumet S., Thiberge J.M., Souarès Y., Failoux A.B. et al. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (5): 910–3.
 45. Mizuno Y., Kato Y., Takeshita N., Ujiie M., Kobayashi T., Kanagawa S. et al. Clinical and radiological features of imported chikungunya fever in Japan: a study of six cases at the National Center for Global Health and Medicine. *J. Infect. Chemother.* 2011; 17 (3): 419–23.
 46. Chaves Tdo S., Pellini A.C., Mascheretti M., Jahn M.T., Ribeiro A.F., Rodrigues S.G. et al. Travelers as sentinels for chikungunya fever, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18 (3): 529–30.
 47. Mavalankar D., Shastri P., Bandyopadhyay T., Parmar J., Ramani K.V. Increased mortality rate associated with Chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14: 412–5.
 48. Department of Public Health of Moscow. Order N 1850, 18.10.2010 "About guaranteeing of actions for the prevention of penetration and distribution of infectious (parasitic) diseases needing in sanitary surviving of the territory of Moscow" (in Russian).
 49. Klimenko S.M., Grigoriev V.B., Manykin A.A. Electron microscopy. In: Lvov D.K. (ed.). *Guide for Virology. Viruses and viral infections of humans and animals*. Moscow: MIA, 2013; 418–21 (in Russian).
 50. Hayat M.A. *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications*. 4th ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 2001.
 51. Alkhovsky S.V., Shchetinin A.M., Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Lvov D.N. et al. The Khurdun virus (KHURV): a new representative of the Orthobunyavirus (Bunyaviridae). *Voprosy virusologii*. 2013; 58(4): 10–3 (in Russian).
 52. Alkhovsky S.V., Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Gitelman A.K. et al. Taxonomy of Baku virus (BAKV; Reoviridae, Orbivirus) isolated from birds obligate Argasidae ticks in Azerbaidzhan, Turkmenistan and Uzbekistan. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(6): 22–6 (in Russian).
 53. Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Uryvaev L.V. Togaviruses (Togaviridae). In: Lvov D.K. (ed.). *Guide for Virology. Viruses and viral infections of humans and animals*. Moscow: MIA; 2013: 334–40 (in Russian).
 54. Larichev V.F., Saifullin M.A., Akinshin Yu.A., Khutoretskaia N.V., Butenko A.M. *Introduced cases of arbovirus infections in Russian Federation. Epidemiologiya i infekcionnye bolezni*. 2012; 1: 35–8 (in Russian).

Поступила 16.01.14
Received 16.01.14

УДК 578.832.1.083.3

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

Масалова О.В., Чичев Е.В., Федякина И.Т., Мукашева Е.А., Климова Р.Р., Щелканов М.Ю., Бурцева Е.И., Иванова В.Т., Куц А.А., Львов Д.К.

Выявление консервативных и вариабельных эпитопов гемагглютини́на штаммов пандемического вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 с помощью моноклональных антител

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва

Цель работы состояла в анализе антигенной структуры гемагглютини́на (НА) штаммов пандемического вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 с помощью моноклональных антител (МКА) и разработке иммуноферментного метода выявления пандемических штаммов. Результаты конкурентного анализа показали, что 6 МКА к НА пандемического вируса гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (Н1N1)swI выявляли 6 эпитопов. Исследовано взаимодействие МКА с 22 штаммами, циркулировавшими на территории РФ в 2009–2012 гг., в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). МКА значительно различались по степени подавления гемагглютинирующей активности штаммов. МКА 5F7 выявляло все исследованные штаммы, МКА 3А3 и 10G2 реагировали с большинством из них. На основе 3 данных МКА разработан высокочувствительный сэндвич-вариант иммуноферментного анализа для выявления штаммов пандемического вируса гриппа и дифференцировки их от сезонных вирусов гриппа. Консервативность эпитопа МКА 5F7 на молекуле НА позволяет использовать его для индикации штаммов пандемического вируса гриппа в РТГА. 3 МКА – 3D9, 6A3 и 1E7, направленные к вариабельным эпитопам НА, чувствительны к нескольким аминокислотным заменам в антигенных сайтах Sa, Sb и Ca₂, а также в рецепторсвязывающем домене. Данные МКА могут использоваться для выявления различий в структуре НА и изучения антигенного дрейфа штаммов пандемического вируса гриппа А(Н1N1)рdm09.

Ключевые слова: пандемический вирус гриппа А(Н1N1)рdm09; моноклональные антитела; антигенная структура гемагглютини́на; консервативные и вариабельные эпитопы.

Для корреспонденции: Масалова Ольга Владимировна, д-р биол. наук, ol.mas@mail.ru

Detection of conservative and variable epitopes of the pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 hemagglutinin using monoclonal antibodies

Masalova O.V., Chichev E.V., Fedyakina I.T., Mukasheva E.A., Klimova R.R., Shchelkanov M.Yu., Burtseva E.I., Ivanova V.T., Kushch A.A., Lvov D.K.

D.I. Ivanovsky Institute of Virology of Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

The goal of this work was to analyze the antigenic structure of the hemagglutinin (HA) of the pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 using monoclonal antibodies (MAbs) and to develop a sandwich ELISA for identification of pandemic strains. Competitive ELISA demonstrated that 6 MAbs against HA of the pandemic influenza A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)pdm09 virus identified six epitopes. Binding of MAbs with 22 strains circulating in Russian Federation during 2009–2012 was analyzed in the hemagglutination-inhibition test (HI). The MAbs differed considerably in their ability to decrease the HI activity of these strains. MAb 5F7 identified all examined strains; MAbs 3A3 and 10G2 reacted with the majority of them. A highly sensitive sandwich ELISA was constructed based on these three MAbs that can differentiate the pandemic influenza strains from the seasonal influenza virus. The constancy of the HA epitope that reacts with MAb 5F7 provides its use for identification of the pandemic influenza strains in HI test. MAbs 3D9, 6A3 and 1E7 are directed against the variable HA epitopes, being sensitive to several amino acid changes in Sa, Sb, and Ca₂ antigenic sites and in receptor binding site. These MAbs can be used to detect differences in HA structure and to study the antigenic drift of the pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09.

Key words: pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09; monoclonal antibodies; antigenic structure of hemagglutinin; conservative and variable epitopes.

Вирус гриппа A(H1N1)pdm09 возник в результате реассортации двух свиных генотипов вируса гриппа A(H1N1) – американского и евразийского весной 2009 г. на территории Мексики и быстро распространился в мире, став этиологическим агентом пандемии 2009–2010 гг. [1, 2] и доминирующим в этиологии подъемов уровня заболеваемости сезонов 2010–2011 и 2012–2013 гг. [3–5]. Результаты антигенного анализа пандемических штаммов показали, что они не претерпели значительного антигенного дрейфа в течение трех сезонов, в то же время отмечена их генетическая вариабельность [3, 6, 7]. В настоящее время для быстрой идентификации возбудителя гриппа наиболее широко используют методы детекции вирусной РНК с помощью различных ПЦР тест-систем [2, 3, 8]. Типирование выделенных штаммов A(H1N1)pdm09 проводят серологическими методами с помощью диагностических поликлональных сывороток, полученных при иммунизации хорьков и крыс [3, 6, 9]. Использование моноклональных антител (МКА) к гемагглютинуину (HA) в качестве специфических иммунных реагентов может существенно повысить качество индикации вирусов гриппа [10–12] и выявить антигенные различия между штаммами. Кроме того, МКА незаменимы при изучении тонкой антигенной структуры HA [13, 14–16].

В зарубежной литературе мало данных об антигенных свойствах вируса A(H1N1)pdm09, так как с помощью МКА были изучены лишь единичные штаммы этого вируса [10, 13, 15]. Нами получена панель из шести вируснейтрализующих МКА к HA штамма вируса гриппа A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl – первого пандемического вируса, выделенного в РФ и депонированного в Государственную коллекцию вирусов РФ при ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского" Минздрава России [1, 17]. При взаимодействии с гомологичным штаммом A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl МКА различались по иммунохимическим свойствам и нейтрализующей активности [17]. Способность МКА выявлять современные штаммы пандемического вируса ранее не исследовали. Можно предположить, что получение таких результатов позволит, с одной стороны, уточнить и дополнить имеющиеся данные об антигенной структуре HA, с другой – усовершенствовать диагностику гриппа.

Цель настоящей работы – с помощью МКА к HA вируса A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl провести анализ антигенных свойств штаммов пандемического вируса гриппа, циркулировавших на территории РФ в 2009–2012 гг., и на основании полученных данных разработать иммунофер-

ментный метод дифференциальной диагностики пандемических вирусов гриппа.

Материалы и методы

Вирусы. Использовали 24 штамма пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, в том числе вирус A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, к которому были получены МКА, эталонный штамм BO3 A/California/07/2009, и 22 штамма, выделенных в РФ в 2009–2012 гг. из носоглоточных смывов и секционного материала. Кроме того, в работу включили штаммы эталонных и сезонных вирусов гриппа А подтипов A(H1N1), A(H2N2) и A(H3N2), вирус гриппа A/Swine/Wisconsin/1/67 A(H1N1), имеющий "свиной" HA, 2 вируса гриппа птиц подтипов A(H5N1) и A(H1N6) и вирус гриппа В. Штаммы перечислены в табл. 1 и 2. Вирусы культивировали в аллантоисной полости 9–10-дневных развивающихся куриных эмбрионов, а также в перевиваемой клеточной линии почки собаки MDCK, как описано ранее [3]. Вирусы получены из Государственной коллекции вирусов РФ при ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского" Минздрава России.

МКА и референс-сыворотки. Использовали 6 МКА (1E7, 3D9, 3A3, 6A3, 5F7, 10G2) к вирусу A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl [17]. Для проведения реакции торможения гемагглютинации (РТГА) МКА использовали в виде асцитных жидкостей. Для выполнения иммуноферментного анализа (ИФА) МКА очищали из асцитных жидкостей с помощью аффинной хроматографии на колонке с Protein A-Sepharose CL-4B (Sigma, США) по методике фирмы. Концентрацию белка в очищенных препаратах МКА определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм. Для идентификации штаммов в РТГА использовали крысиные референс-сыворотки против штаммов пандемического вируса гриппа A/IV-Moscow/01/2009 и A/California/07/2009, полученные в ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского" Минздрава России [3].

РТГА проводили с использованием 0,75% взвеси эритроцитов человека I (0) группы или кур по стандартной методике [2, 3]. Доза вирусов гриппа для использования в РТГА составляла 8 агглютинирующих единиц в реакции гемагглютинации (РГА).

Конъюгацию очищенных МКА с пероксидазой хрена (Sigma, США) выполняли перйодатным методом [18].

Сандвич-вариант ИФА для выявления вирусов гриппа выполняли, как описано ранее [11]. Кратко: МКА сорбировали в лунки 96-луночных панелей в концентрации 5

Взаимодействие МКА со штаммами пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированными в РФ в 2009–2012 гг., в РТГА

Штамм пандемического вируса гриппа А(H1N1) pdm09	МКА **						Крысиная сыворотка ***
	5F7	3A3	10G2	1E7	3D9	6A3	
A/IV-Moscow/01/2009	51200	25600	25600	102400	51200	102400	1280
A/California/07/2009							
A/IV-Anadyr/177/2009 *							—
A/IV-Elista/64/2009							—
A/IV-Magadan/173/2009							—
A/IV-Moscow/80/2009							—
A/IV-Sakhalin/186/2009							—
A/IV-Moscow/34/2010							—
A/IV-Moscow/36/2010							—
A/IV-Anadyr/101/2011							—
A/IV-Anadyr/102/2011							—
A/IV-Brynsk/54/2011 *							—
A/IV-Krasnodar/918/2011							—
A/IV-Moscow/04/2011							—
A/IV-Moscow/13/2011							—
A/IV-Moscow/40/2011							—
A/IV-Moscow/83/2011 *							—
A/IV-N.Novgorod/ 41/2011 *							—
A/IV-Vel.Novgorod/95/2011*							—
A/IV-Vel.Novgorod/96/2011*							—
A/IV-Vladimir/68/2011*							—
A/IV-Vladimir/35/2011 *							—
A/IV-Yaroslavl/32/2011							—
A/IV-Tomsk/19/2012							—

Примечание:

*– штаммы выделены из секционного материала от пациентов с летальным исходом [2,3];

**– МКА получены к пандемическому вирусу гриппа A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1;

***– поликлональная сыворотка получена при иммунизации крыс штаммом A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1. Цифрами обозначены титры МКА в РТГА с гомологичным вирусом; "—" не исследовали. Штаммы с установленной последовательностью HA (см. табл. 3) выделены жирным шрифтом. Условные обозначения: степень антигенного родства HA штаммов с HA вируса A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 выражена как доля гомологичного титра с МКА в РТГА

	≥ 25%	(титр ≥ 1/4)
	6 – 24%	(1/16 ≤ титр < 1/4)
	1,5 – 5%	(1/64 ≤ титр < 1/16)
	< 1,5%	(титр < 1/64)

мкг/мл; после отмывки в лунки добавляли вирусосодержащие жидкости, инкубировали 2 ч при 37°C. Затем добавляли конъюгаты – МКА к HA вируса гриппа, меченные пероксидазой хрена, и инкубировали 1 ч при 37°C. Выявление ферментативной активности связавшейся пероксидазы проводили с использованием субстрата тетраметилбензидин (Sigma, США). Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном иммуноферментном анализаторе "Sunrise" (Tecan, Швейцария) при длине волны 450/620 нм. Пробы считали положительными, если их ОП превышала критическую. Последнюю вычисляли как среднюю ОП отрицательных контролей (незараженные аллантаические или культуральные жидкости, контроль конъюгата) плюс две величины стандартного отклонения.

Конкурентный ИФА проводили, как описано ранее [11], с некоторыми модификациями. В лунки 96-луночной панели, предварительно сенсibilизированные вирусом гриппа A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 (2 мкг/мл), наносили очищенные МКА в концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4°C. После отмывки добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена МКА в разведениях, позволяющих получить ОП в пределах 1–1,5 при взаимодействии с вирусом гриппа в отсутствие конкурирующих МКА, и инкубировали 1 ч при 37°C. Спектрофотометрическое измерение активности пероксидазы проводили, как описано выше. Конкурентные отношения между МКА выражали как степень подавления связывания меченых МКА (конъю-

гатов) с вирусом гриппа конкурирующими немечеными МКА и выражали в процентах.

Анализ аминокислотных последовательностей пандемических вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 и выравнивание аминокислотных остатков (а.о.) штаммов проводили с помощью международной базы данных GenBank [19]. А.о. в НА нумерованы со стартового метионина с учетом сигнального пептида – а.о. в позиции 18 соответствует позиции 1 в зрелом НА после отщепления сигнального пептида [20, 21].

Результаты и обсуждение

Исследовали взаимодействие панели МКА к НА штамма А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 в РТГА с 22 штаммами пандемического вируса гриппа, изолированными на территории РФ в 2009–2012 гг. Установили значительные различия по степени подавления МКА гемагглютинирующей активности штаммов А(Н1N1)pdm09 (см. табл. 1). МКА 5F7 выявляло все исследованные штаммы, при этом отметили высокое антигенное родство вируса А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 и 18 штаммов по эпитопу, к которому направлено данное МКА (25–100% гомологичного титра). Активность взаимодействия МКА 5F7 в РТГА с другими 4 штаммами отличалась в большей степени (6–12% гомологичного титра). МКА 3A3 и 10G2 с титрами, сходными с гомологичными, реагировали в РТГА с 16 и 13 штаммами соответственно. Среднюю степень родства (6–24% гомологичного титра) по эпитопам, опознаваемым данными МКА, обнаружили между вирусом А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 и 4 штаммами. С рядом штаммов антигенное родство оказалось ничтожно мало – не более 5% гомологичного титра. МКА 3A3 и 10G2 не выявляли в РТГА штаммы А/IV-Moscow/13/2011 и А/IV-Yaroslavl/32/2011 соответственно.

МКА 1E7, 3D9 и 6A3 активно (> 25% гомологичного титра) выявляли в РТГА только 2–3 штамма из 22 исследованных (см. табл. 1). Среднюю степень родства (6–24% гомологичного титра) по эпитопам А/IV-Moscow/01/2009, реагирующим с МКА 1E7, 3D9 и 6A3, обнаружили в 13, 5 и 3 пандемических штаммах соответственно. Остальные вирусы либо не реагировали с данными МКА, либо реагировали очень слабо.

Гемагглютинирующую активность эталонного штамма А/California/07/2009 все 6 МКА ингибировали так же эффективно, как и гомологичный вирус (см. табл. 1). МКА не реагировали в РТГА с эталонными и сезонными вирусами гриппа А подтипов, отличных от А(Н1N1)pdm09, и с вирусом гриппа В (титры < 1:100, результаты не представлены).

При постановке РТГА с поликлональными диагностическими сыворотками против вирусов А/IV-Moscow/01/2009 и А/California/07/2009 установили, что большинство изученных вирусов гриппа активно реагировали с сывороткой против А/IV-Moscow/01/2009 (25–100% гомологичного титра) (см. табл. 1). 3 штамма (А/IV-Moscow/34/2010, А/IV-Vladimir/68/2011 и А/IV-Yaroslavl/32/2011) отличались от вируса А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 более значительно (12,5% гомологичного титра), что можно расценивать как антигенные варианты. Сыворотка против вируса А/California/07/2009 взаимодействовала со всеми исследованными штаммами практически одинаково (≥ 25% гомологичного титра) и не дифференцировала антигенные варианты (результаты не показаны). Абсолютные значения титров в РТГА поликлональных сывороток были меньше таковых в 20–80 раз при использовании МКА.

Из представленных данных следует, что МКА 5F7, 3A3 и 10G2 обладали широким спектром взаимодей-

ствия практически со всеми изученными штаммами, при этом определяли высокую и среднюю степень гомологии с вирусом А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1. Это означает, что данные МКА направлены к консервативным эпитомам НА и могут применяться для идентификации штаммов пандемического вируса гриппа. Напротив, МКА 3D9 и 6A3 не выявляли до 30% штаммов, с остальными реагировали в низких титрах. Данные МКА направлены к вариабельным эпитомам НА и могут быть использованы для выявления антигенных различий в структуре НА пандемических штаммов. МКА 1E7 занимало промежуточное положение: большинство штаммов выявляли с помощью данного МКА, но степень антигенного родства НА этих штаммов с НА А/IV-Moscow/01/2009 была относительно невысокой (6–24% гомологичного титра). Следует отметить, что активность взаимодействия МКА с пандемическими штаммами не зависела ни от времени их циркуляции, ни от исхода заболевания (см. табл. 1).

Антигенную специфичность МКА исследовали методом реципрокного конкурентного анализа. Все МКА подавляли реакцию связывания гомологичных конъюгатов с вирусом гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 (результаты не представлены). Частичное взаимное блокирование связывания (на 28–53%) показано между МКА 5F7 – 10G2 и 3A3 – 10G2. Кроме того, отметили несимметричное ингибирование реакции между разными МКА. Например, МКА 3D9 и 6A3 ингибировали связывание с вирусом только гомологичных конъюгатов, которые в свою очередь слабо реагировали с вирусом в присутствии МКА 5F7, 3A3, 10G2 и 1E7. Наиболее сильным конкурентом проявило себя МКА 5F7, которое блокировало взаимодействие с вирусом конъюгатов всех 6 МКА. Данные конкурентного анализа свидетельствуют о том, что МКА распознают 6

Таблица 2
Выявление штаммов пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 с помощью МКА методом сэндвич-ИФА

Подтип	Штамм вируса гриппа*	Титр вируса в РГА	ОП в ИФА**
А(Н1N1)pdm09	А/IV-Moscow/01/2009	1:2	3,0
	А/California/07/2009	1:32	3,0
	А/IV-Anadyr/177/2009	1:16	3,0
	А/IV-Elista/64/2009	1:4	2,1
	А/IV-Krasnodar/918/2011	1:2	2,3
	А/IV-Anadyr/101/2011	< 1:2	0,6
	А/IV-Moscow/83/2011	< 1:2	0,7
	А/IV-N.Novgorod/41/2011	< 1:2	0,3
	А/IV-Vladimir/35/2011	< 1:2	0,2
А(Н1N1)sw	А/Swine/Wisconsin/1/67	1:4	0,04***
	А(Н1N1)	А/Pekin/262/95	1:128
А(Н2N2)	А/Singapore/1/57	1:128	0,06
	А(Н3N2)	А/Brisbane/10/07	1:128
А(Н5N1)	А/chicken/Primorje/1/08	1:256	0,03
А(Н11N6)	А/duck/England/56	1:16	0,02
В	В/Brisbane/60/08	1:32	0,04

Примечание. * – аллантоисные и культуральные вируссодержащие жидкости в разведениях 1:2 – 1:10; ** – состав сэндвич-ИФА: «захватывающие» антитела – смесь МКА 5F7 и 10G2, детектирующие антитела – смесь конъюгатов МКА 5F7 и 3A3; *** – отрицательные результаты определения вирусов (ОП критическая 0,07).

близко расположенных, но различных эпитопов на молекуле HA. Результаты антигенного картирования HA методом эскейп-мутантов показали [14], что МКА 5F7, 3A3, 1E7, 3D9 и 6A3 направлены к сайту Sa (ключевые а.о. K170, G172, N173, N142, а.о. нумерованы как указано в разделе "Материалы и методы"), а МКА 10G2 – к топографически близкому сайту Sb (D204). Конкуренция между МКА 5F7 и 3A3 с 10G2 позволяет предположить, что МКА 5F7, 3A3 и/или 10G2 направлены к эпитопам, перекрывающим сайты Sa и Sb HA. О способности МКА взаимодействовать с консервативными а.о., локализованными в двух и даже в трех антигенных сайтах HA (Sa, Sb и Ca₂), недавно сообщили [16].

Для выяснения причин различного взаимодействия штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с МКА в РТГА провели анализ последовательностей HA, помещенных в GenBank [19]. По сравнению с вирусом гриппа A/IV-Moscow/01/2009 в 5 пандемических штаммах 2009–2012 гг. в молекуле HA выявлено 17 позиций а.о., в которых произошли замены (табл. 3). В эталонном штамме ВОЗ A/California/07/2009 обнаружили 4 аминокислотные замены по сравнению с A/IV-Moscow/01/2009. Судя по результатам РТГА, выявивших полную гомологию этого штамма с A/IV-Moscow/01/2009 по всем 6 МКА (см. табл. 1), можно заключить, что замены S100P, T220S, Q240R и V338I не влияют на антигенные свойства. Экспериментальные данные подтвердили, что мутация, приводящая к замене T220S, практически не отражается на активности взаимодействия штаммов с поликлональной сывороткой против A/California/07/09 [9].

В штамме A/IV-Anadyr/177/2009, выделенным от пациента с летальной первичной вирусной пневмонией (см. табл. 1) [2], выявили 3 замены, в том числе и вышеперечисленную V338I (см. табл. 3). Все МКА, кроме

1E7, активно реагировали с этим штаммом (см. табл. 1). Таким образом, снижение взаимодействия МКА 1E7 с вирусом может быть вызвано заменами в позициях K226T и/или D239G. В то же время замена D239G (или по номенклатуре зрелого HA H1 – D222G) ассоциируется не с изменением антигенных свойств, а с расширением рецепторной специфичности: вирусы с такой мутацией чаще выделяют от больных с летальным исходом заболевания из секционного материала нижних дыхательных путей [2, 5, 9, 20].

Отметили значимое снижение антигенного родства A/IV-Moscow/01/2009 со штаммами A/IV-Vladimir/35/2011, A/IV-Moscow/83/2011 и A/IV-Tomsk/19/2012 по эпитопам, взаимодействующим с МКА 1E7, 3D9, 6A3, и 2 последних штаммов – также с МКА 10G2 (см. табл. 1). В данных штаммах обнаружили 4 замены в одинаковых позициях: D114N, S202T, E391K и S468N (см. табл. 3). Штаммы с подобными мутациями зарегистрированы [22], однако их антигенная характеристика не представлена. Замена E391K широко распространилась уже в конце 2009 г.; предполагают, что эта мутация усиливает взаимодействие между мономерами HA и играет определенную роль в слиянии мембран [7]. Результаты исследования ряда штаммов с заменой E391K с поликлональными сыворотками хорьков в РТГА показали, что на антигенные свойства HA эта замена не влияет [6]. А.о. E391 и S468 входят в состав малой субъединицы HA2 и, по-видимому, не могут менять антигенную специфичность указанных штаммов в отношении полученных МКА, которые реагируют с антигенными сайтами Sa и Sb в глобулярной части молекулы [14], образованной последовательностями большой субъединицы HA1. Остаток S202 входит в состав антигенного сайта Sb [21], к которому направлено МКА 10G2 [14]; с 2 из 3 штаммов с данной мутацией МКА 10G2 реагирует в РТГА слабо

Таблица 3

Аминокислотные замены в молекуле HA штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09

Аминокислотная позиция в HA штамма A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl	Штамм вируса гриппа				
	A/California/07/2009	A/IV-Anadyr/177/2009	A/IV-Vladimir/35/2011	A/IV-Moscow/83/2011	A/IV-Tomsk/19/2012
ACR46981*	AFM72832	ADC54195	AEI87742	AEI87582	AFH41323
S100	P**	—***	—	—	—
D114	—	—	N	N	N
T137	—	—	—	A	—
S138	—	—	—	—	N
H155	—	—	—	—	R
A156	—	—	V	—	—
N173	—	—	—	D	—
S202	—	—	T	T	T
T220	S	—	—	—	—
K226	—	T	—	—	—
D239	—	G	X	—	—
Q240	R	—	—	—	—
V266	—	—	—	—	L
V338	I	I	—	—	—
E391	—	—	K	K	K
K460	—	—	—	E	—
S468	—	—	N	N	N

Примечание. * – номер аминокислотной последовательности HA штамма в GenBank [19]; ** – замена а.о. в штамме по сравнению с последовательностью штамма A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl; а.о. в HA нумерованы со стартового метионина с учетом сигнального пептида [20, 21]; *** – а.о., идентичные с последовательностью штамма A/IV-Moscow/01/09 (H1N1)swl.

(см. табл. 1). В штаммах A/IV-Vladimir/35/2011, A/IV-Moscow/83/2011 и A/IV-Tomsk/19/2012, кроме того, обнаружили несколько индивидуальных дополнительных мутаций, которые приводят к заменам в регионе 137–266 а.о., но нам не удалось найти сведений об их влиянии на антигенные свойства. Часть измененных аминокислот картирована в сайте Ca₂ (H155R, A156V), замена N173D – в сайте Sa, этот а.о. входит в эпитопы для МКА 3А3, 1Е7, 3D9, 6А3 [14]; в непосредственной топологической близости локализован рецепторсвязывающий домен [21]. Изучение более широкого набора генетически охарактеризованных вирусов с помощью МКА позволит расширить существующие представления об антигенной структуре и эволюции НА пандемических вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, а также своевременно выявлять штаммы с потенциально опасными мутациями.

Полученные данные послужили основой для разработки иммуноферментного метода дифференциальной диагностики пандемических штаммов вируса гриппа с помощью сандвич-варианта ИФА. До настоящего времени описана одна зарубежная тест-система, в которой использованы 2 МКА к НА пандемического вируса гриппа A/California/04/2009 [12], однако описание свойств данных МКА отсутствует. В настоящей работе для выявления вируса использовали МКА, которые направлены к наиболее консервативным эпитопам НА, опознаваемым МКА 5F7, 3А3 и 10G2, а также 1Е7. МКА 5F7 выбрали в качестве необходимого компонента сандвича в связи с широкой специфичностью взаимодействия с пандемическими вирусами в РТГА (см. табл. 1). Провели испытания около 20 вариантов сандвича. Оптимальным оказалось сочетание из 3 МКА к консервативным эпитопам: смесь МКА 5F7 и 10G2 в качестве «захватывающих» антител и смесь конъюгатов МКА 5F7 и 3А3 – в качестве детектирующих антител (см. табл. 2). Достигнуто избирательное определение штаммов пандемического вируса гриппа, вирусы других подтипов гриппа А и вирусы гриппа В в сандвиче не выявлялись. Важно, что некоторые штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 не обладали гемагглютинирующей активностью (титр в РГА < 1:2), тогда как ОП сигнала этих вирусов в сандвич-ИФА превышала порог чувствительности реакции более чем в 2,5 раза. Высокая чувствительность метода внушает надежду, что разработанный вариант сандвич-ИФА позволит определять пандемические вирусы гриппа A(H1N1)pdm09 непосредственно в материалах от больных, до выделения штаммов на куриных эмбрионах или в культуре клеток.

Заключение

Показано, что полученные МКА к пандемическому вирусу гриппа A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl выявляют 6 разных эпитопов на молекуле НА. МКА различаются по антигенному средству к НА штаммов A(H1N1)pdm09, циркулировавших в РФ в 2009–2012 гг. 1 МКА – 5F7, направлено к наиболее консервативному эпитопу на молекуле НА и может быть использовано для индикации штаммов пандемического вируса гриппа в РТГА. 2 других эпитопов, опознаваемых МКА 3А3 и 10G2, также достаточно консервативны в структуре белка. С применением 3 данных МКА разработан высокочувствительный сандвич-вариант ИФА для дифференциального выявления пандемических вирусов гриппа. В противоположность этому 3 других МКА – 3D9, 6А3 и 1Е7 направлены к вариабельным эпитопам НА, чувствительны к аминокислотной замене в позиции D114N, нескольким заменам в антигенных сайтах Sa, Sb (S202T) и Ca₂, а также в рецепторсвязывающем домене. Предварительные итоги эпидемического сезона 2012–2013 гг. показав-

ли, что как в РФ, так и в странах Европейского региона штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 стали ведущей причиной подъема уровня заболеваемости. МКА 3D9, 6А3 и 1Е7 могут использоваться для выявления различий в структуре НА штаммов A(H1N1)pdm09 в РТГА и изучения антигенного дрейфа штаммов пандемического вируса гриппа, выделенных в период последующих эпидемических сезонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г. Базарова М.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н. и др. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ №2452 от 24.05.2009) первого штамма A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, подобного свиному вирусу A(H1N1), от первого выявленного 21.05.2009 больного в Москве. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54 (5): 10–4.
2. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чукалин А.Г., Колобухина Л.В. и др. 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 пневмонии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (1): 14–20.
3. Бурцева Е.И., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Альховский С.В. и др. Особенности социологии вирусов гриппа в постпандемический период 2010–2011 гг. по итогам деятельности центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (1): 20–8.
4. Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю., Прошина Е.С., Кириллов И.М., Кружкова И.С., Богданова В.С. и др. Клинико-патогенетические особенности и оптимизация противовирусной терапии пандемического гриппа А (H1N1) pdm09. *Вопросы вирусологии*. 2012; Приложение 1: 189–98.
5. Львов Д.К. Рождение и развитие вирусологии – история изучения новых и возвращающихся вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2012; Приложение 1: 5–20.
6. Barr I.G., Cui L., Komadina N., Lee R., Lin R., Deng Y. et al. A new pandemic influenza A(H1N1) genetic variant predominated in the winter 2010 influenza season in Australia, New Zealand and Singapore. *Euro Surveill*. 2010; 15 (42). Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19692> (Accessed 21 October 2010).
7. Maurer-Stroh S., Lee R.T., Eisenhaber F., Cui L., Phuah S.P., Lin R.T. et al. A new common mutation in the hemagglutinin of the 2009 (H1N1) influenza A virus. *PLoS Curr*. 2010; 2. Available at: <http://currents.plos.org/influenza/article/a-new-common-mutation-in-the-3rs9-rooc15v8f-1/> (Accessed 1 June 2010).
8. Zhou B., Wentworth D.E. Influenza A virus molecular virology techniques. *Methods Mol. Biol.* 2012; 865: 175–92.
9. Galiano M., Agapow P., Thompson C., Platt S., Underwood A., Ellis J. et al. Evolutionary pathways of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 in the UK. *PLoS One*. 2011; 6 (8). Available at: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0023779> (Accessed 24 August 2011).
10. Cabral T.M., Berhane Y., Schmidt L., Tracz D., Hole K., Leith M. et al. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against the pandemic H1N1 virus (2009). *J. Virol. Methods*. 2012; 183 (1): 25–33.
11. Masalova O.V., Klimova R.R., Chichev E.V., Fediakina I.T., Loginova S.Y., Borisevich S.V. et al. Development of monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus and their application to diagnostics, prophylaxis, and therapy. *Acta Virol*. 2011; 55: 3–14.
12. Yuan Q., Cheng X.D., Yang B.C., Zheng Q.B., Chen Y.X., Chen Q.R. et al. Differential diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 infection by detection of haemagglutinin with an enzyme-linked immunoassay. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17 (10): 1574–80.
13. Manicassamy B., Medina R.A., Hai R., Tsibane T., Stertz S., Nistal-Villán E. et al. Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines. *PLoS Pathog*. 2010; 6 (1). Available at: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000745> (Accessed 29 January 2010).
14. Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., Shilov A., Kushch A., Masalova O. et al. Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: Variations in antigenic specificity and receptor affinity of the

hemagglutinin. *Virus Res.* 2012; 166 (1–2): 61–7.

15. Schmeisser F., Friedman R., Besho J., Lugovtsev V., Soto J., Wang W. et al. Neutralizing and protective epitopes of the 2009 pandemic influenza H1N1 hemagglutinin. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013; 7(3): 480–90. doi 10.1111/irv.12029.
16. Tsibane T., Ekiert D., Krause J.C., Martinez O., Crowe J.E., Wilson I. et al. Influenza human monoclonal antibody 1F1 interacts with three major antigenic sites and residues mediating human receptor specificity in H1N1 viruses. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (12). Available at: <http://www.plospathogens.org/article/doi/10.1371/journal.ppat.1003067> (Accessed 6 December 2012).
17. Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А. и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, обладающие высокой вируснейтрализующей активностью. *Вопросы вирусологии.* 2011; 56 (3):15–20.
18. Nakane P., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22: 1084–91.
19. *NCBI Influenza Virus Sequence Database (2010)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi> (Accessed 17 May 2010).
20. Glinsky G. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. *Cell Cycle.* 2010; 9 (5): 958–70.
21. Igarashi M., Ito K., Yoshida R., Tomabechi D., Kida H., Takada A. et al. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One.* 2010; 5 (1). Available at: <http://www.plosone.org/article/doi/10.1371/journal.pone.0008553> (Accessed 1 Jan 2010).
22. Ellis J., Galiano M., Pebody R., Lackenby A., Thompson C., Birmingham A. et al. Virological analysis of fatal influenza cases in the United Kingdom during the early wave of influenza in winter 2010/11. *Euro Surveill.* 2011; 6 (1). Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19760> (Accessed 06 January 2011).

REFERENCES

1. Lvov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bazarova M.V., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N. et al. The 24 May, 2009 isolation of the first A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl strain similar to swine A(H1N1) influenza virus from the first Moscow case detected on May 21, 2009, and its deposit in the State Collection of Viruses (SCV No. 2452 dated May 24, 2009). *Voprosy virusologii.* 2009; 54 (5): 10–4 (in Russian).
2. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., Kolobukhina L.V. et al. Correlation between the receptor specificity of pandemic influenza A (H1N1)pdm09 virus strains isolated in 2009–2011 and the structure of the receptor-binding site and the probability of fatal primary viral pneumonia. *Voprosy virusologii.* 2012; 57 (1): 14–20 (in Russian).
3. Burtseva E.I., Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Prilipov A.G., Alkhovsky S.V. et al. The specific features of the cocirculation of influenza viruses in the 2010–2011 postpandemic period according to the results of activities of the D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia. *Voprosy virusologii.* 2012; 57 (1): 20–8 (in Russian).
4. Kolobukhina L.V., Shchelkanov M.Yu., Proshina E.S., Kirillov I.M., Kruzhkova I.S., Bogdanova V.S. et al. Clinic and pathogenetic peculiarities and optimization of antiviral therapy of pandemic influenza A(H1N1)pdm09. *Voprosy virusologii.* 2012; Suppl. 1: 189–98 (in Russian).
5. Lvov D.K. Birth and development of Virology – the history of emerging-reemerging viral infection investigations. *Voprosy virusologii.* 2012; Suppl.1: 5–20 (in Russian).
6. Barr I.G., Cui L., Komadina N., Lee R., Lin R., Deng Y. et al. A new pandemic influenza A(H1N1) genetic variant predominated in the winter 2010 influenza season in Australia, New Zealand and Singapore. *Euro Surveill.* 2010; 15 (42). Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19692> (Accessed 21 October 2010).
7. Maurer-Stroh S., Lee R.T., Eisenhaber F., Cui L., Phuah S.P., Lin R.T. et al. A new common mutation in the hemagglutinin of the 2009 (H1N1) influenza A virus. *PLoS Curr.* 2010; 2. Available at: <http://currents.plos.org/influenza/article/a-new-common-mutation-in-the-3rs9-rooc15v8f-1/> (Accessed 1 June 2010).
8. Zhou B., Wentworth D.E. Influenza A virus molecular virology techniques. *Methods Mol. Biol.* 2012; 865: 175–92.
9. Galiano M., Agapow P., Thompson C., Platt S., Underwood A., Ellis J. et al. Evolutionary pathways of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 in the UK. *PLoS One.* 2011; 6 (8). Available at: <http://www.plosone.org/article/doi/10.1371/journal.pone.0023779> (Accessed 24 August 2011).
10. Cabral T.M., Berhane Y., Schmidt L., Tracz D., Hole K., Leith M. et al. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against the pandemic H1N1 virus (2009). *J. Virol. Methods.* 2012; 183 (1): 25–33.
11. Masalova O.V., Klimova R.R., Chichev E.V., Fediakina I.T., Logina S.Y., Borisevich S.V. et al. Development of monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus and their application to diagnostics, prophylaxis, and therapy. *Acta virologica.* 2011; 55: 3–14.
12. Yuan Q., Cheng X.D., Yang B.C., Zheng Q.B., Chen Y.X., Chen Q.R. et al. Differential diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 infection by detection of haemagglutinin with an enzyme-linked immunoassay. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17 (10): 1574–80.
13. Manicassamy B., Medina R.A., Hai R., Tsibane T., Stertz S., Nistal-Villán E. et al. Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (1). Available at: <http://www.plospathogens.org/article/doi/10.1371/journal.ppat.1000745> (Accessed 29 January 2010).
14. Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., Shilov A., Kushch A., Masalova O. et al. Escape mutants of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus: Variations in antigenic specificity and receptor affinity of the hemagglutinin. *Virus Res.* 2012; 166 (1–2): 61–7.
15. Schmeisser F., Friedman R., Besho J., Lugovtsev V., Soto J., Wang W. et al. Neutralizing and protective epitopes of the 2009 pandemic influenza H1N1 hemagglutinin. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2012; DOI: 10.1111/irv.12029.
16. Tsibane T., Ekiert D., Krause J.C., Martinez O., Crowe J.E., Wilson I. et al. Influenza human monoclonal antibody 1F1 interacts with three major antigenic sites and residues mediating human receptor specificity in H1N1 viruses. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (12). Available at: <http://www.plospathogens.org/article/doi/10.1371/journal.ppat.1003067> (Accessed 6 December 2012).
17. Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Leshnova E.I., Oskerko T.A. et al. Monoclonal antibodies with high virus-neutralizing activity against pandemic influenza virus A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl. *Voprosy virusologii.* 2011; 56 (3): 15–20 (in Russian).
18. Nakane P., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22: 1084–91.
19. *NCBI Influenza Virus Sequence Database (2010)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi> (Accessed 17 May 2010).
20. Glinsky G. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. *Cell Cycle.* 2010; 9 (5): 958–70.
21. Igarashi M., Ito K., Yoshida R., Tomabechi D., Kida H., Takada A. et al. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One.* 2010; 5 (1). Available at: <http://www.plosone.org/article/doi/10.1371/journal.pone.0008553> (Accessed 1 Jan 2010).
22. Ellis J., Galiano M., Pebody R., Lackenby A., Thompson C., Birmingham A. et al. Virological analysis of fatal influenza cases in the United Kingdom during the early wave of influenza in winter 2010/11. *Euro Surveill.* 2011; 6 (1). Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19760> (Accessed 06 January 2011).

Поступила 21.03.13
Received 21.03.13