

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 578.831.31:578.53

Кривицкая В.З., Синцова К.С., Петрова Е.Р., Сверлова М.В., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Суховецкая В.Ф., Соминина А.А.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА, ВЫДЕЛЕННЫХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2013—2016 гг.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

Впервые представлена антигенная и генетическая характеристика российских изолятов респираторно-синцициального вируса (РСВ). Из 69 штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге, 93% принадлежали к антигенной группе РСВ-А. Антигенные вариации в F-белке РСВ оценивали с помощью панели из 6 моноклональных антител методом микрокультурального иммуноферментного анализа (ИФА). В зависимости от снижения (по отношению к референс-штамму Long) эффективности взаимодействия с моноклональными антителами изоляты РСВ-А были разделены на 4 антигенные подгруппы. Результаты секвенирования 24 изолятов показали, что более 60% из них имели замены в значимых сайтах F-белка по сравнению с референс-вирусом ON67-1210A современного генотипа РСВ ON1/GA2. Наиболее вариабельными были сигнальный пептид и антигенный сайт II. При сравнении результатов ИФА и секвенирования не удалось выявить какие-либо определённые ключевые замены в аминокислотной последовательности F-белка, влияющие на взаимодействие вируса с антителами. Нуклеотидная последовательность F-гена 19 из 24 охарактеризованных изолятов была близка к таковой референс-вируса ON67-1210A и значительно отличалась от РСВ-А Long и A2. Отдельную группу составили 5 штаммов, у которых структура F-белка была приближена к РСВ Long.

Ключевые слова: респираторно-синцициальный вирус; клинические изоляты; F-белок; моноклональные антитела; антигенные сайты; филогенетический анализ.

Для цитирования: Кривицкая В.З., Синцова К.С., Петрова Е.Р., Сверлова М.В., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Суховецкая В.Ф., Соминина А.А. Генетическая и антигенная характеристика штаммов респираторно-синцициального вируса, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 273-282. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-273-282>

Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova E.R., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Komissarov A.B., Fadeev A.V., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Afanaseva V.S., Sukhovetskaya V.F., Sominina A.A.

GENETIC AND ANTIGENIC CHARACTERISTICS OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS STRAINS ISOLATED IN ST. PETERSBURG IN 2013-2016

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Antigenic and genetic characteristics of Russian RSV isolates are presented for the first time. Of the 69 strains isolated in St. Petersburg, 93% belonged to the RSV-A antigenic group. The antigenic variations in the F-protein RSV were analyzed using a panel from 6 monoclonal antibodies by the method of micro-cultural ELISA. Depending on the decrease in the effectiveness of interaction with monoclonal antibodies (relative to the reference strain Long), RSV-A isolates were divided into 4 antigenic subgroups. The results of 24 isolates sequencing showed that more than 60% of them had substitutions in significant F-protein sites compared to the ON67-1210A reference strain of the current RSV genotype ON1/GA2. The most variable were the signal peptide and antigenic site II. When comparing the results of ELISA and sequencing, it was not possible to identify any specific key substitutions in the amino acid sequence of the F-protein that affect the interaction of the virus with antibodies. The nucleotide sequence of the F-gene from 19 of the 24 characterized isolates was close to that of ON67-1210A reference virus and was significantly different from RSV-A Long and A2 viruses. A separate group consisted of 5 strains, in which the F-protein structure was approximated to RSV Long.

Key words: respiratory syncytial virus; clinical isolates; F-protein; monoclonal antibodies; antigenic sites; phylogenetic analysis.

For citation: Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova E.R., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Komissarov A.B., Fadeev A.V., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Afanaseva V.S., Sukhovetskaya V.F., Sominina A.A. Genetic and antigenic characteristics of respiratory syncytial virus strains isolated in St. Petersburg in 2013-2016. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 273-282. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-273-282>

For correspondence: Vera Z. Krivitskaya, PhD, Leading researcher, Laboratory of Influenza and ARVI risk factors, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Information about authors:

Krivitskaya V.Z., <http://orcid.org/0000-0002-9146-0816>;

Tsareva T.R., <http://orcid.org/0000-0003-4757-0521>;

Pisareva M.M., <http://orcid.org/0000-0002-9545-7649>;

Sominina A.A., <http://orcid.org/0000-0002-1015-595X>

Sorokin E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1732-1727>;

Komissarov A.B., <http://orcid.org/0000-0003-1733-1255>;

Buzitskaya Zh.V., <http://orcid.org/0000-0002-8394-102X>;

Для корреспонденции: Кривицкая Вера Зорьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории изучения факторов риска при гриппе и острых респираторных вирусных инфекциях ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Acknowledgments. This work was partially supported by the Foundation «Scientific research of the role of influenza viruses in development of severe forms of acute viral respiratory infections in hospitalized patients» in the framework of the International Project «Global Influenza Hospital-based Surveillance Network», Branch: Russian Federation, St. Petersburg, instituted by the Foundation for Influenza Epidemiology (France).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 17 August 2017

Accepted 25 August 2017

Введение

Актуальность проведенного исследования определяется значимостью респираторно-синцитиальной вирусной (РСВ) инфекции (РСВИ) в структуре инфекционной патологии дыхательных путей, особенно среди детей первых двух лет жизни и престарелых людей. В России надзор за распространением РСВИ осуществляется в рамках традиционного и сигнального надзора. В период эпидемии 2012—2013 гг. доля РСВИ среди госпитализированных детей первого года жизни в Санкт-Петербурге составила 13,5% (частота, сравнимая с данными по диагностированию гриппа), а среди людей старше 75 лет — 5,9% [1]. В настоящее время большое внимание уделяется изучению механизмов изменчивости РСВ. Характеристику антигенной вариабельности вирусных белков с последующим сопоставлением с результатами секвенирования проводят с использованием РСВ-специфичных моноклональных антител (МКА) [2, 3]. В зависимости от особенностей взаимодействия с МКА циркулирующие РСВ относят к двум антигенным группам (РСВ-А и РСВ-В), которые подразделяются на множество генетических вариантов. В один и тот же эпидемический сезон в одном регионе могут социркулировать вирусы, принадлежащие к нескольким генотипам (до 12) с постепенной селекцией 1—2 вариантов к концу сезона под действием иммунологического пресса. РСВ-А и РСВ-В социркулируют в различных пропорциях практически во время всех эпидемий. В большинстве случаев превалирует РСВ-А [4]. Филогенетические отношения циркулирующих РСВ строят по результатам секвенирования *F*- и *G*-генов, кодирующих 2 основных поверхностных гликопротеина вируса. Структура более вариабельного *G*-гена лежит в основе наиболее распространенной классификации. Система генотипирования РСВ по *F*-гену разработана слабо. Наиболее полная филогенетическая характеристика РСВ по *F*-гену дана в работах Н. Кимуры и соавт. [5, 6], в которых авторы приходят к выводу о независимой эволюции *F*- и *G*-генов РСВ. С учетом того, что *F*-белок является основным индуктором синтеза вируснейтрализующих протективных антител (АТ) [7], становится понятной необходимость дальнейшего изучения изменчивости не только *G*-, но и *F*-гена, а также антигенной вариабельности *F*-белка современных циркулирующих РСВ. Антигенные особенности функционально значимых вирусных детерминант необходимо учитывать при создании вакцин и противовирусных препаратов.

Антигенные и генетические свойства РСВ, циркулирующих на территории России, практически не изучены, что обуславливает актуальность характеристики отечественных изолятов. Целью настоящей работы являлась оценка антигенной вариабельности *F*-белка современных РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге, с использованием полученных МКА, а также характеристика *F*-гена этих вирусов.

Методы

Выделение РСВ из клинических материалов в культуре клеток.

РСВ выделяли в клеточной культуре МА-104 (получены из коллекции Музея вирусов ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа») из назофарингеальных мазков, взятых на 2—4-й день ОРВИ у детей в возрасте от 9 дней до 14 лет, госпитализированных в клиники Санкт-Петербурга в 2013—2016 гг. Наличие РНК РСВ в исходном клиническом материале определяли при помощи ПЦР в реальном времени. В качестве референс-вирусов использовали эталонные штаммы РСВ: Long (РСВ-А), полученный из National Institute for Medical Research (Лондон), A2 (РСВ-А) и 9320 (РСВ-В), полученные из коллекции Influenza Reagent Resource (IRR) (Университет Амстердама, Нидерланды).

Микрокультуральный ИФА (мк-ИФА).

Для оценки антигенных свойств изолятов РСВ был разработан вариант мк-ИФА. Монослойные культуры клеток МА-104, выращенные в 96-луночных планшетах («Thermo Scientific Nunc», Дания), инфицировали вирусами (100 ТЦД₅₀). Через 7—10 дней клетки в лунках фиксировали ацетоном, после чего в них вносили *F*-специфичные МКА в различных разведениях. Для последующей детекции МКА, связавшихся с внутриклеточным *F*-белком, добавляли пероксидазный конъюгат козьих АТ к IgG мыши («Sigma», США). После добавления субстратной смеси оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD₄₅₀). Подробно метод мк-ИФА был описан нами ранее [8]. В целях стандартизации результатов метода эффективность взаимодействия каждого штамма с МКА (в выбранном рабочем разведении 1—2 мкг/мл) выражали в процентах от уровня связывания (OD₄₅₀) данного типа МКА с вирусом-иммуногеном РСВ Long. Полученные параметры были приняты за положительные контроли связывания (K⁺), равные 100%.

Генетические исследования.

Для генетического анализа использовали новые изоляты РСВ (1—2-й пассажи, проведенные в культуре клеток МА-104). Вирусную РНК выделяли с помощью коммерческого набора QIAamp Viral RNA Mini Kit («QIAGEN», Германия). ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени для определения РСВ-А или РСВ-В проводили по технологии TaqMan с использованием набора реагентов QIAGEN One-Step RT-PCR Kit («QIAGEN», Германия). Детекцию выполняли по двум каналам: FAM ($\lambda = 520$ нм), Cy5.5 ($\lambda = 703$ нм), использовали термоциклер CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler («BioRad», США). Программа амплификации: 95°C 10 мин; 45 циклов — 95°C 3 с; 55°C 10 с; 65°C 60 с.

Для ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени использовали авторские праймеры:

hRSVA-F AGA TCA ACT TCT GTC ATC CAG CAA
hRSVA-R TTC TGC ACA TCA TAA TTA GGA GTA
TCA AT



Рис. 1. Дендрограмма F-гена, характеризующая филогенетические отношения изолятов РСВ, выделенных в 2013—2016 гг.

Указаны референсные штаммы-прародители (Long, A2), вирус ON67-1210A, определяющий группу ON1/GA2 по G-гену.

hRSVA-P (FAM)CAC CAT CCA ACG GAG CAC AGG
AGA T(RTQ1)
hRSVB-F GGC TGA ATC ATT TCC TCA CAT CAT G
hRSVB-R CTTCTACCATTCAAGCAATGACCTCTAAT
hRSVB-P (Cy5.5)TTACATAAAAACCTCAAGTATCA
CAATCAAACACTAAATCGACA(BHQ2).

ОТ-ПЦР для амплификации F-гена РСВ-А проводили с использованием праймеров, предложенных E. Agenbach и соавт. [9] в собственной модификации. Для амплификации G-гена РСВ использовали авторские праймеры:

M 1 3 F - h R S V A - F 1
T G T A A A A C G A C G G C C A G T
GGGGCAAATAACAATGGAGTT
h R S V A - F 2
CAGCAAAGTGTTAGACCTCAA
h R S V A - R 3
GTTTACCTTTTACATAGAGACT
M13R-hRSVA-R4 CAGGAAACAGCTATG
CATTGTAAGAACATGATTAGGTGCT
M13F-hRSVAB-G (F)
T G T A A A A C G A C G G C C A G T
GCAAATGCAAACATGTCCAAA
M 1 3 R - h R S V A - G (R)
C A G G A A A C A G C T A T G C A
ACYATACGCTTTTAAATGACTA.

Для ОТ-ПЦР применяли комплект реагентов QIAGEN One-Step PCR Kit («QIAGEN», Германия). Программа ОТ-ПЦР: 50°C 45 мин; 95°C 15 мин; 94°C 1 мин; 52°C 30 с; 72°C 3 мин (40 циклов); 72°C 10 мин. Молекулярную массу ДНК после гель-электрофореза в агарозе определяли при помощи маркера (1 kb, «Thermo Scientific», США). Секвенирование осуществляли методом Сэнгера с использованием коммерческого набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Программа секвенирующей реакции: 96°C 10 с, 50°C 5 с, 60°C 4 мин (25 циклов). Праймеры для секвенирования использовали те же, что и для ОТ-ПЦР. Нуклеотидные последовательности определяли 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Капиллярный электрофорез проводили в полимере ABI PRISM 3130 POP-7 («Applied Biosystems», США). Сборку нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе ContigExpress пакета Vector NTI 10 Advance («Invitrogen», США). Для выравнивания последовательностей и филогенетического анализа (построения филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия, модель Тамура-3 с гамма-распределением, бутстрэп 1000) использовали программу MEGA 7.

Результаты

Генетическая характеристика изолятов РСВ.

Проведен сравнительный анализ результатов секвенирования F-гена 24 изолятов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг. По данным ОТ-ПЦР, все вирусы принадлежали к РСВ-А, референс-штаммами которого являются Long (изолирован в 1956 г. в США) и A2 (выделен в Австралии в 1961 г.). В соответствии с критериями, предложенными Кимурой [5], по структу-

ре *F*-гена большинство изолятов (за исключением пяти) можно отнести к генотипу GA2, для которого характерны аминокислотные (АК) замены (по отношению к штамму Long) V384I и N276S. Два вируса из этой группы (RSV/St Petersburg/5904/2014 и RSV/St Petersburg/5577/2014) имели другую мутацию в 276-м положении (N276H), которая не рассматривалась Кимурой. Тем не менее данные вирусы лучше всего вписались в схему, определяющую генотип GA2. Особый кластер составили 5 вирусов (RSV/St Petersburg/479/2014, RSV/St Petersburg/4734/2014, RSV/St Petersburg/16063/2014, RSV/St Petersburg/14597/2014 и RSV/St Petersburg/14959/2014), у которых была выявлена замена V384I, но АК-остаток (АО) в положении 276 остался неизменённым по сравнению с РСВ Long. Поскольку замена V384I характерна для всех генотипов РСВ-А, описанных Кимурой, а другие установленные нами мутации не укладывались в предложенную им схему, на данный момент классифицировать эту группу изолятов по структуре *F*-гена не представляется возможным. Это свидетельствует о недостатке данных о генетических особенностях современных циркулирующих РСВ и необходимости дальнейшего изучения структуры *F*-гена.

Следует отметить, что помимо *F*-гена у 20 из 24 рассмотренных изолятов, в том числе у 5 штаммов без замены в 276-м положении, было проведено секвенирование *G*-гена. По структуре *G*-гена все эти вирусы относились к генотипу ON1/GA2 [3]. Референс-штамм РСВ-А ON67-1210А, отнесенный по результатам секвенирования *G*-гена к этому генотипу, был выделен в 2010 г. в Онтарио (Канада). Для вирусов данного генотипа характерна инсерция 72 нуклеотидов в *G*-гене, которая отсутствовала у РСВ, циркулировавших ранее [10]. В последние годы практически во всех странах в циркуляции преобладают вирусы РСВ-А генотипа ON1/GA2 (согласно классификации по *G*-гену) [3, 11].

Для оценки филогенетических отношений между вирусами, выделенными в Санкт-Петербурге, и РСВ, циркулировавшими в это же время (2013—2016) в других регионах мира, был проведен сравнительный анализ структуры *F*-гена с учетом информации, имеющейся в базе данных GenBank (рис. 1). Большая часть проанализированных вирусов оказалась близка к референс-штамму ON1/GA2 и далеко отошла от вирусов-прародителей. В эту же группу вошли 17 из 22 изолятов из Санкт-Петербурга, включённых в построение дендрограммы. Отдельную группу составили 5 штаммов: RSV/St Petersburg/479/2014, RSV/St Petersburg/4734/2014, RSV/St Petersburg/16063/2014, RSV/St Petersburg/14597/2014 и RSV/St Petersburg/14959/2014. По сравнению с другими РСВ у них отсутствовали замены R213S и N276S, которые показаны для всех штаммов РСВ-А 2013—2016 годов выделения (согласно данным GenBank). Такая особенность структуры *F*-белка приближает эти вирусы к РСВ Long, у которого в этих положениях также находятся аргинин и аспарагин. В дополнение к этому у штамма RSV/St Petersburg/479/2014 в положении 124 выявлен лизин (К), как у Long и A2, а не аспарагин (N), как у всех остальных проанализированных РСВ (рис. 2).

Антигенная характеристика F-белка изолятов РСВ.

Для локализации АК-замен и оценки их значимости для функционирования вируса по результатам литературного поиска была составлена антигенная карта *F*-белка РСВ (табл. 1).

С учётом этих данных и результатов секвенирования оценивали вариабельность *F*-белка у 24 штаммов РСВ,

выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг. Межштаммовые вариации были незначительны. Изменения в аминокислотной последовательности (АП) между изолятами наблюдали лишь по 29 позициям, что соответствовало 95% идентичности. При этом 3 переменных позиции приходились на сигнальный пептид. При сравнении с РСВ Long у всех 24 изолятов была выявлена достаточно высокая частота замен во многих функционально значимых регионах *F*-белка, включая антигенные сайты (АГ-сайты) с АП 205—221, АГ-сайты I и II, ответственные за индукцию синтеза вируснейтрализующих АТ, а также в области HR2, участвующей в конформационных перестройках *F*-белка при его созревании (рис. 3, а). Сравнение с современным референс-вирусом ON67-1210А показало, что 46% (11/24) полученных нами изолятов имели замены в нескольких сайтах и еще 17% (4/24) — лишь одну мутацию. Наиболее вариабельным являлся сигнальный пептид: 59% штаммов имели замены в этом регионе. Изменения в области АГ-сайта с АП 205—221 и АГ-сайта II (АП 255—278) выявлены в 21 и 29% случаев соответственно (рис. 3, б).

У 69 штаммов РСВ 2013/2014 годов выделения антигенные особенности были оценены в мк-ИФА с использованием 6 полученных нами МКА, направленных к конформационно-зависимым сайтам *F*-белка. Ранее было показано, что МКА RS-25, 9С5 и 4F2 направлены к эпитопам *F*-белка, перекрывающимся на 65—70%, но не имеющих общих сайтов реагирования с МКА 5F3, 5Н8 и 1НЗ, которые также не конкурировали друг с другом за связь с вирусом. МКА 5F3 и 5Н8 обладали вируснейтрализующей активностью по отношению к РСВ-А [8]. Изоляты были предварительно типированы как РСВ-А или РСВ-В методом ОТ-ПЦР в реальном времени. К РСВ-А было отнесено 93% штаммов (64/69). Все МКА были получены к РСВ Long и обладали по отношению к нему одинаково высокой активностью в мк-ИФА. В зависимости от снижения эффективности взаимодействия с различными *F*-специфичными МКА изоляты были разделены на 5 подгрупп, 4 из которых составили РСВ-А.

Изоляты из подгруппы 1 слабее, чем РСВ Long, реагировали только с нейтрализующими МКА 5Н8, вирусы из подгруппы 2 в дополнение к этому — еще и с МКА 1НЗ. РСВ-А из подгруппы 3, как и РСВ-В, характеризовались более слабым взаимодействием с тремя МКА — 5Н8, 1НЗ и 5F3. С РСВ из малочисленной группы 4 слабее реагировали 4 МКА — 5Н8, 1НЗ, 5F3 и 4F2. Нейтрализующие МКА RS-25, 9С5 и 4F2 взаимодействовали с изолятами РСВ-А и РСВ-В практически так же интенсивно, как и с Long, что свидетельствует о консервативности их эпитопов-мишеней (табл. 2).

Была предпринята попытка выявить ключевые АК-замены в АП *F*-белка, влияющие на связь антиген/анти-тело. С этой целью для 18 изолятов 2013/2014 годов трех подгрупп (1, 2 и 3 согласно табл. 2) было проведено сопоставление уровня снижения активности МКА в мк-ИФА с характерными (по отношению к Long) АК-заменами в *F*-белке. Большая часть охарактеризованных штаммов ($n = 13$) из подгрупп 2 и 3 имели одинаковые мутации в *F*-белке, отличающие их от РСВ Long и других изолятов: R213S в АГ-сайте с АП 205—221 и N276H/S в АГ-сайте II. При этом не было выявлено каких-либо определённых мутаций, позволивших дифференцировать штаммы из подгрупп 2 и 3. У остальных 5 вирусов, характеристики которых представлены в табл. 3, АО в этих двух положениях не отличались от таковых у РСВ Long. У вируса RSV/St Petersburg/14597/2014 в отличие от других штаммов, в

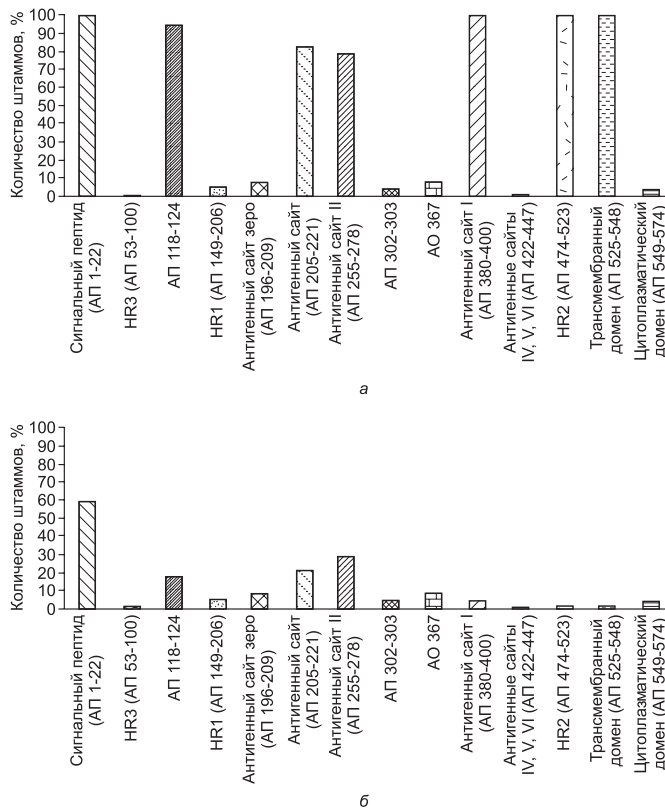


Рис. 3. Частота аминокислотных замен в различных сайтах F-белка изолятов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014—2016 гг., в сравнении с РСВ Long (а) и РСВ ON67-1210А (б).

том числе из той же подгруппы 3, была выявлена уникальная замена Q302P. У вирусов RSV/St Petersburg/479/2014 и RSV/St Petersburg/14959/2014 из подгруппы 1 значительное снижение эффективности реагирования с нейтрализующими МКА 5Н8 ассоциировано с характерной заменой С367G/W, не встречающейся ни у одного из РСВ 2013—2016 годов выделения, представленных в базе данных GenBank. У RSV/St Petersburg/16063/2014 (антигенная подгруппа 2) и RSV/St Petersburg/4734/2014 (подгруппа 3) в F-белке отсутствовали замены, характерные для других изолятов. Однако секвенирование G-белка показало наличие множественных замен, характерных именно для этих двух вирусов, в консервативном рецепторном сайте РСВ с АП 164—198 (см. табл. 3, рис. 2).

Таким образом, у изолятов РСВ-А, принадлежащих согласно нашей классификации к разным антигенным подгруппам, снижение уровня реагирования с одними и теми же МКА могло быть вызвано различными мутациями в разных АГ-сайтах F-белка. С другой стороны, некоторые филогенетически близкие вирусы (в том числе 5 штаммов из отдельного кластера) были отнесены к разным антигенным подгруппам.

Обсуждение

Впервые была получена антигенная и генетическая характеристика российских изолятов РСВ. Показано, что 93% вирусов, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг., относились к РСВ-А. Нуклеотидная последовательность F-гена 19 из 24 охарактеризованных

изолятов была близка к таковой референс-штамма ON67-1210A современного генотипа ON1/GA2 и значительно отличалась от вирусов-прародителей Long и A2. Пять штаммов, выделенных в 2014 г., составили отдельную группу, не укладывающуюся в рамки классификации Кимуры [5]. Следует отметить, что по данным секвенирования G-гена эти 5 штаммов подобно остальным изолятам из Санкт-Петербурга относились к современному генотипу ON1/GA2. При этом АП их F-белка была более архаичной и приближенной к РСВ Long, чем у других РСВ, циркулировавших в последние годы как в Санкт-Петербурге, так и в других регионах мира. Примечательно, что еще одну обособленную группу составили вирусы RSV-A/US/BID-V/2013 (GenBank: KJ643534.1, KJ643548.1, J643565.1, KJ643577.1, KJ643588.1), циркулировавшие в 2013 г. в Теннесси, США. Их особенностью, общей с полученными нами изолятами из отдельного кластера, являлось отсутствие (по сравнению с РСВ Long) замены N276S в F-белке, которая характерна практически для всех штаммов РСВ-А 2013—2016 годов выделения независимо от места их циркуляции (по данным GenBank). При этом по структуре G-белка американские вирусы принципиально отличались от всех изолятов из Санкт-Петербурга. Они не имели нуклеотидной вставки, т. е. относились к другому генотипу. Эти данные подтверждают концепцию о независимой эволюции F- и G-генов РСВ [5].

Последовательность F-белка современных изолятов из Санкт-Петербурга в достаточной мере отличалась не только от таковой РСВ Long, но и от референсного вируса того же генотипа. Сравнение с современным референсным штаммом ON67-1210A показало, что более 60% отечественных вирусов имели замены в значимых сайтах F-белка. Наиболее варибельным оказался сигнальный пептид, что согласуется с данными других исследователей [11]. Треть РСВ из Санкт-Петербурга имели также замену в АГ-сайте II (АП 255—278), с которым взаимодействует основная масса эффективных вируснейтрализующих АГ [7, 14].

Наличие антигенных вариаций в F-белке циркулирующих вирусов оценивают с помощью F-специфичных МКА [27, 28]. Панель полученных нами разнонаправленных МКА к F-белку позволила оценить антигенную вариативность изолятов РСВ из Санкт-Петербурга в разработанном варианте мк-ИФА. В результате проведенного исследования не удалось связать изменения антигенных свойств вирусов, следствием чего являлось снижение (по сравнению с РСВ Long) эффективности взаимодействия с МКА, в том числе вируснейтрализующими, с какими-либо определенными единичными АК-заменами в F-белке. Эти данные согласуются с наблюдениями других исследователей. Так, антигенное картирование G-белка некоторых изолятов РСВ из Германии, проведенное с использованием G-специфичных МКА известной эпитопной направленности, не выявило корреляции между изменениями активности МКА и какими-либо определенными АК-заменами в сайтах связывания АГ [2]. У изолятов из Санкт-Петербурга сходные изменения антигенных свойств могли быть вызваны совершенно разными, характерными для них заменами в F-белке, такими как R213S, N276S/H, Q302P, C367G/W. Согласно данным литературы, эти АО играют важную роль в функционировании РСВ, а замены в этих положениях могут значительно изменить его антигенные свойства. Так, АО 213 входит в состав рецепторного сайта F-белка, а также АГ-сайта,

Антигенная карта F-белка РСВ

Сайт F-белка (аминокислотная последовательность)	Функция сайта F-белка при РСВИ	Источник
NH2 — 1—22	Сигнальный пептид (NH2-конец цепи F-белка)	[12]
23—52	Сайт с неизвестной функцией	[11]
51—66	CD4+ T-клеточный эпитоп (преимущественно для Th1)	[13]
62—69	Антигенный сайт Ø (zero). Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[14]
53—100	Heptad repeat domain 3(F2) *	[15]
95—106	CD8+ T-клеточный эпитоп	[16]
106—109	Первый сайт разрезания предшественника F-белка (F0)	[17]
131—136	Второй сайт разрезания предшественника F-белка (F0)	[17]
131—147	Рецепторная функция. Взаимодействие с гепарансульфатами клеточных мембран	[18]
137—154	Пептид слияния. Взаимодействие с клеточной мембраной	[19]
146—160	CD4+ T-клеточный эпитоп	[20]
149—206	Heptad repeat domain 1	[15]
183—199	CD4+ T-клеточный эпитоп. Активация вирусспецифичных Th1 и Th2	[20]
196—209	Антигенный сайт Ø (zero)	[14]
201—217	Рецепторная функция. Взаимодействие с гепарансульфатами клеточных мембран	[18]
205—221	Индукция синтеза нейтрализующих антител	[21]
222—237	Индукция синтеза нейтрализующих антител	[21]
249—258	CD8+ T-клеточный эпитоп	[16]
255—278	Антигенный сайт II. Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[14]
262—276	Сайт связывания с паливизумабом (F-специфичные гуманизированные нейтрализующие антитела)	[22, 23]
276—379	Сайт с неизвестной функцией	[11]
380—400	Антигенный сайт I. Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[11]
404—420	Гепаринсвязывающий сайт. Взаимодействие с гепарансульфатами клеточных мембран	[18]
412—524	CD4+ T-клеточный сайт. Активация вирусспецифичных Th1 и Th2	[24]
422—447	Антигенные сайты IV, V, VI. Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[25]
474—523	Heptad repeat domain 2	[15]
483—488	Индукция синтеза нейтрализующих антител	[26]
525—548	Трансмембранный домен	[12]
54—574—COOH	Цитоплазматический домен (COOH-конец цепи F-белка)	[12]

Примечание. * — три консервативных гидрофобных домена (heptad repeat domain) F-белка, образованы биспиралями α -участков со звеном спирали из 7 АО, участвуют в конформационных перестройках при созревании F0, что необходимо для высвобождения пептида слияния.

который индуцирует синтез вируснейтрализующих АТ [18, 21]. Замена положительно заряженного аргинина на незаряженный серин может повлечь за собой локальные пространственные сдвиги в структуре молекулы белка и изменения ее антигенных свойств. АО 276 принадлежит к АГ-сайту II (АП 255—278), к которому направлены РСВ-нейтрализующие АТ, в том числе препарат гуманизированных МКА паливизумаб (PVZ). Показано, что замена N276S у РСВ-А вызывает снижение связывания с PVZ, а также провоцирует возникновение других мутаций (K272E), приводящих к полной резистентности к препарату [22, 23]. АО 302 и 367 входят в регион F-белка с неизвестной функцией. Тем не менее известно, что пролин действует как структурный разрушитель регулярных элементов вторичной структуры пептидной цепи, таких как альфа-спирали и бета-листы, что приводит к конформационным изменениям молекулы. Положение цистеинов в белках РСВ, как правило, исключительно консерва-

тивно, поскольку они стабилизируют пространственную конфигурацию белков S=S-связями [25]. Поэтому замены Q302P или C367G/W с большой долей вероятности повлекут за собой изменения конформации и антигенных свойств белка в эпитопе.

Для двух вирусов из антигенных подгрупп 2 и 3 снижение взаимодействия с МКА не было связано с какими-либо заменами в АП F-белка, характерными для других изолятов. Однако анализ результатов секвенирования G-белка показал наличие характерных именно для этих изолятов множественных замен в сайте с АП 164—198. Этот регион вовлечен в белок-белковые взаимодействия при создании трёхмерной структуры молекулы G-белка. Известно, что помимо сложной пространственной организации мономеров и тримеров F-белок образует гетероолигомеры с G-белком за счет S=S-связей [29]. Если учесть эти данные, такие значимые замены в G-белке, как появление отрицательно заряженных остатков аспа-

Таблица 2

Антигенная характеристика F-белка штаммов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге от пациентов с ОРВИ в 2013—2014 гг. (по результатам мк-ИФА)

Вирусы	Антигенная группа вирусов	№ под-группы*	Число штаммов	Эффективность взаимодействия РСВ с МКА, % **					
				RS-25	9C5	5F3	4F2	5H8	1H3
Long (1956), референс-штамм	PCB-A	—	1	100	100	100	100	100	100
9320 (1979), референс-штамм	PCB-B	5	1	82	79	32	94	23	20
Штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге	PCB-A	1	18	86 ± 10	90 ± 9	84 ± 11	95 ± 5	53 ± 12	83 ± 5
	PCB-A	2	17	89 ± 12	88 ± 9	87 ± 8	94 ± 4	57 ± 10	61 ± 9
	PCB-A	3	27	90 ± 8	87 ± 8	68 ± 4	93 ± 5	46 ± 8	64 ± 7
	PCB-A	4	2	85 ± 12	86 ± 7	60 ± 4	43 ± 7	43 ± 7	60 ± 6
	PCB-B	5	5	88 ± 8	89 ± 3	36 ± 3	90 ± 5	34 ± 9	36 ± 4

Примечание. * — согласно данным антигенного анализа, проведенного с использованием полученных МКА; ** — % от уровня связывания данного типа МКА с PCB Long, принятого за 100% (положительный контроль K+). Здесь и в табл. 3: темно-серым цветом выделены случаи, когда показатели OD₄₅₀ составляли 60—75% от K+, светло-серым — показатели OD₄₅₀ ниже 60% от показателя K+. Доза заражения вирусами составляла 100 ПЦД₅₀, рабочая концентрация МКА при детекции F-белка в мк-ИФА — 1—2 мкг/мл.

Таблица 3

Сопоставление антигенной и генетической характеристик F-белка РСВ, выделенных от пациентов, госпитализированных в Санкт-Петербурге в 2014 г.

Штамм	Антигенная под-группа*	Взаимодействие РСВ с МКА**						Характерные замены по отношению к PCB Long	Локализация характерных замен
		RS-25	9C	5F3	4F	5H	1H		
Long	—	100	100	100	100	100	100	—	—
RSV/St Petersburg/479/2014	1	93	93	79	92	46	90	F-белок: C367G	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 367)
RSV/St Petersburg/14959/2014	1	80	81	78	85	59	90	F-белок: C367W	Антигенный сайт F-белка (АП 205—221); рецепторный сайт F-белка (АП 201—217); антигенный сайт II F-белка (АП 255—278)
RSV/St Petersburg/5577/2014	2	100	79	99	100	59	55	F-белок: R213S,	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 302—303)
RSV/St Petersburg/13764/2014	2	92	93	99	106	70	68		
RSV/St Petersburg/5934/2014	2	100	95	98	118	72	38	F-белок: N276S/H	Центральный консервативный домен G-белка (АП 151—190); рецепторный гепаринсвязывающий сайт G-белка (АП 183—198)
RSV/St Petersburg/7108/2014	2	100	100	90	85	51	75		
RSV/St Petersburg/878/2013	3	88	88	68	93	37	65	F-белок: Q302P	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 302—303)
RSV/St Petersburg/4210/2014	3	87	86	70	94	48	69		
RSV/St Petersburg/1086/2014	3	90	91	72	98	53	71	G-белок: H164D, F168Y, P172T, S174R, N178R, W183R, R188T, I189K, N191I, K193N	Центральный консервативный домен G-белка (АП 151—190); рецепторный гепаринсвязывающий сайт G-белка (АП 183—198)
RSV/St Petersburg/8951/2014	3	81	85	68	92	52	60		
RSV/St Petersburg/10891/2014	3	99	99	60	90	35	60	G-белок: F168V, S177R, P194N, G195D, K197N, T198K	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 302—303)
RSV/St Petersburg/3546/2014	3	100	100	67	97	44	75		
RSV/St Petersburg/6979/2014	3	96	81	69	96	57	71	G-белок: F168V, S177R, P194N, G195D, K197N, T198K	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 302—303)
RSV/St Petersburg/14349/2014	3	88	88	63	85	42	58		
RSV/St Petersburg/5904/2014	3	97	88	75	93	45	50	G-белок: F168V, S177R, P194N, G195D, K197N, T198K	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 302—303)
RSV/St Petersburg/14597/2014	3	86	92	69	86	37	58		
RSV/St Petersburg/16063/2014	2	100	88	90	100	73	50	G-белок: F168V, S177R, P194N, G195D, K197N, T198K	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 302—303)
RSV/St Petersburg/4734/2014	3	79	81	72	96	44	71		

Примечание. * — согласно данным, представленным в табл. 2; ** — для каждого штамма результаты взаимодействия с МКА выражены в % от уровня связывания данного МКА с PCB Long, принятого за 100% (положительный контроль K+).

рагиновой кислоты в положении 164 или 195, положительно заряженных остатков лизина/аргинина в положениях 174, 178, 183 и 189 или 177 и 198 вместо незаряженных аминокислот, а также замена лизина/аргинина на незаряженные АО (R188T, K193N или K197N), не могли

не повлиять на пространственную структуру G-белка, а, возможно, и комплексированного с ним F-белка.

Большинство РСВ-специфичных АТ, особенно нейтрализующих, взаимодействуют с конформационно-зависимыми эпитопами вирусных белков [7, 14]. От-

существование прямой корреляции между определенными единичными АК-заменами в F-белке и изменениями антигенных свойств вируса может быть связано с тем, что мутации в эпитопе-мишени для связи с АТ способны повлечь за собой конформационные сдвиги как непосредственно в данном сайте, так и в прилегающих регионах, а также, возможно, не только в F-белке. Со своей стороны мутации в G-белке могут влиять на комплексированный с ним F-белок, вызывая в нем локальные пространственные изменения, которые могут сказываться на эффективности взаимодействия с АТ. Отсутствие корреляции между единичными АК-заменами и изменениями его антигенных свойств можно рассматривать как косвенное подтверждение концепции об отсутствии позитивной селекции изменений F-белка РСВ (в отличие от наличия таковой для G-белка) под действием иммунного пресса и о возможной роли негативной селекции — элиминации из популяции вирусов, с которыми активно взаимодействуют противовирусные АТ [5, 22].

Финансирование. Часть работы была выполнена при финансовой поддержке гранта «Scientific research on study the role of influenza viruses in development of severe forms of acute viral respiratory infections in hospitalized patients» in frames of international project «Global Influenza Hospital-based Surveillance Network», Branch: Russian Federation, St. Petersburg», учрежденного Фондом по этиологии гриппа, Франция (The Foundation for Influenza Epidemiology).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—7, 9—29 см. REFERENCES)

- Соминина А.А., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Осидак Л.В., Суховещкая В.Ф., Афанасьева О.И. и др. Особенности этиологии респираторных вирусных инфекций у госпитализированных больных в зависимости от демографических, социально-экономических факторов и предшествующей вакцинации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; (3): 74—83.
- Кривичкая В.З., Петрова Е.Р., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Сверлова М.В., Фадеев А.В. и др. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу. *Биотехнология*. 2016; (1): 65—75.

REFERENCES

- Sominina A.A., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Osidak L.V., Sukhovetskaya V.F., Afanasyeva O.I., et al. Peculiarities of Etiology of Respiratory Virus Infections in Hospitalized Patients Depending on the Demographic, Socio-Economic Factors and Previous Vaccination. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2015; (3): 74—83. (in Russian)
- Adams O., Werzmirzowsky J., Hengel H. Genetic analysis and antigenic characterization of human respiratory syncytial virus group A viruses isolated in Germany 1996—2008. *Virus Genes*. 2013; 47(2): 210—8.
- Trento A., Ábrego L., Rodríguez-Fernández R., González-Sánchez M.I., González-Martínez F., Delfraro A., et al. Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution? *J. Virol.* 2015; 89(15): 7776—85.
- Melero J., Moore M. Influence of respiratory syncytial virus strain differences on pathogenesis and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 72: 59—82.
- Kimura H., Nagasawa K., Tsukagoshi H., Matsushima Y., Fujita K., Yoshida L.M., et al. Molecular evolution of the fusion protein gene in human respiratory syncytial virus subgroup A. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 43: 398—406.
- Kimura H., Nagasawa K., Kimura R., Tsukagoshi H., Matsushima Y., Fujita K., et al. Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respiratory syncytial virus subgroup B. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 52: 1—9.
- Melero J.A., Mas V. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus. Res.* 2015; 209: 128—35.
- Krivitskaya V.Z., Petrova E.R., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Sverlova M.V., Fadeev A.V., et al. Design and Characteristics of Monoclonal Antibodies Specific to Respiratory Syncytial Virus. *Biotechnologiya*. 2016; (1): 65—75. (in Russian)
- Agenbach E., Tiemessen C.T., Venter M. Amino acid variation within the fusion protein of respiratory syncytial virus subtype A and B strains during annual epidemics in South Africa. *Virus Genes*. 2005; 30(2): 267—78.
- Eshaghi A., Duvvuri V.R., Lai R., Nadarajah J.T., Li A., Patel S.N., et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One*. 2012; 7(3): e32807.
- Tapia L.L., Shaw C.A., Aideyan L.O., Jewell A.M., Dawson B.C., Haq T.R., et al. Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90786.
- Day N.D., Branigan P.J., Liu C., Gutshall L.L., Luo J., Melero J.A., et al. Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function. *Viol. J.* 2006; (3): 34.
- Castilow E.M., Varga S.M. Overcoming T cell-mediated immunopathology to achieve safe RSV vaccination. *Future Virol.* 2008; 3(5): 445—54.
- McLellan J.S. Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *Curr. Opin. Virol.* 2015; (11): 70—5.
- Lambert D.M., Barney S., Lambert A.L., Guthrie K., Medinas R., Davis D.E., et al. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc. Natl. Acad. USA*. 1996; 93: 2186—91.
- Johnstone C., Guil S., Rico M.A., García-Barreno B., López D., Melero J.A., et al. Relevance of viral context and diversity of antigen-processing routes for respiratory syncytial virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 9): 2194—203.
- Zimmer G., Budz L., Herrler G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(34): 31642—50.
- Crim R.L., Audet S.A., Feldman S.A., Mostowski H.S., Beeler J.A. Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity. *J. Virol.* 2007; 81(1): 261—71.
- Martin D., Calder L.J., García-Barreno B., Skehel J.J., Melero J.A. Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt. 6): 1649—58.
- Tripp R.A., Hou S., Etchart N., Prinz A., Moore D., Winter J., et al. CD4(+) T cell frequencies and Th1/Th2 cytokine patterns expressed in the acute and memory response to respiratory syncytial virus I-E(d)-restricted peptides. *Cell Immunol.* 2001; 207(1): 59—71.
- Morton C.J., Cameron R., Lawrence L.J., Lin B., Lowe M., Luttick A., et al. Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. *Virology*. 2003; 311(2): 275—88.
- Adams O., Bonzel L., Kovacevic A., Mayatepek E., Hoehn T., Vogel M. Palivizumab-resistant human respiratory syncytial virus infection in infancy. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51(2): 185—8.
- Zhu Q., McAuliffe J.M., Patel N.K., Palmer-Hill F.J., Yang C.F., Liang B., et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J. Infect. Dis.* 2011; 203: 674—82.
- Singh S.R., Dennis V.A., Carter C.L., Pillai S.R., Jefferson A., Sahi S.V., et al. Immunogenicity and efficacy of recombinant RSV-F vaccine in a mouse model. *Vaccine*. 2007; 25(33): 6211—23.
- López J.A., Bustos R., Orvell C., Berois M., Arbiza J., García-Barreno B., et al. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Virol.* 1998; 72(8): 6922—8.
- Scopes G.E., Watt P.J., Lambden P.R. Identification of linear epitope on the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virology*. 1990; 71: 53—9.
- Oliveira D.B., Iwane M.K., Prill M.M., Weinberg G.A., Williams J.V., Griffin M.R., et al. Molecular characterization of respiratory syncytial viruses infecting children reported to have received palivizumab immunoprophylaxis. *J. Clin. Virol.* 2015; 65: 26—31.
- Zhu Q., Patel N.K., McAuliffe J.M., Zhu W., Wachter L., McCarthy M.P., et al. Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV): effects on RSV susceptibility to palivizumab. *J. Infect. Dis.* 2012; 205(4): 635—8.
- Low K.W., Tan T., Ng K., Tan B.H., Sugrue R.J. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 366(2): 308—13.

Поступила 17.08.17

Принята в печать 25.08.17