

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Тимофеева Т.А.<sup>1</sup>, Руднева И.А.<sup>1</sup>, Шилов А.А.<sup>1</sup>, Баланова М.А.<sup>1</sup>, Артемов Е.К.<sup>1</sup>, Куц А.А.<sup>1</sup>, Масалова О.В.<sup>1</sup>, Климова Р.Р.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1,2</sup>, Каверин Н.В.<sup>1</sup>

## ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭСКЕЙП-МУТАНТОВ И РЕАДАПТАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)pdm09 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ МУТАЦИЙ В МОЛЕКУЛЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, 123098, г. Москва, Россия; <sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, 117198, г. Москва, Россия

**Введение.** После появления и распространения пандемического вируса H1N1 2009 г. путём селекции эскейп-мутантов было проведено исследование антигенных эпитопов, распознаваемых вируснейтрализующими антителами против гемагглютинаина (HA) вируса гриппа A/Moscow/01/09(H1N1)pdm09. **Цели и задачи.** Получение реадaptированных вариантов вируса из низковирулентного эскейп-мутанта, обладающего повышенной аффинностью к клеточным рецепторам «птичьего» и «человечьего» типа по сравнению с диким типом, и сравнительное изучение их антигенной и рецепторной специфичности. **Материал и методы.** Вирусы накапливали в 10-дневных куриных эмбрионах. Панель моноклональных антител (МКАТ) против HA вируса гриппа штамма A/IIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 использовали в виде асцитных жидкостей мышей. Иммунизацию мышей, реакцию торможения гемагглютинации, элюцию вируса с куриных эритроцитов, полимеразную цепную реакцию и секвенирование реадaptированных вариантов проводили стандартными способами. **Результаты.** Приобретённая в процессе реадaptации мутация A198E приводит к изменениям антигенной специфичности. Выявлена корреляция между снижением вирулентности у низковирулентного эскейп-мутанта, ассоциированным с заменой D190N в молекуле гемагглютинаина, и увеличением гемагглютинирующего титра к ингибиторам в нормальной мышинной сыворотке, взятой от неиммунных мышей. Вирусы с низкой аффинностью к аналогам клеточных рецепторов и несущие аминокислотные замены, которые приводят к снижению электростатического заряда поверхности молекулы HA, обладают повышенной способностью элюировать с куриных эритроцитов. **Обсуждение.** Продемонстрировано влияние мутаций в молекуле HA вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на такие важные функциональные свойства вируса, как изменение антигенной специфичности; вирулентности для мышей, адсорбции-элюции на клеточных рецепторах. **Заключение.** Проведённое сравнительное изучение антигенной специфичности и рецепторсвязывающей активности эскейп-мутантов, полученных к HA вируса гриппа A/Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, и реадaptированных вариантов, полученных к одному из эскейп-мутантов, обладающему сниженной вирулентностью для мышей. Мониторинг плейотропного эффекта мутаций в молекуле H1 необходим для прогнозирования вариантов вируса, обладающих пандемическим потенциалом.

**Ключевые слова:** вирус гриппа A(H1N1)pdm09; гемагглютинин H1; аминокислотные замены; антигенная специфичность; рецепторсвязывающая активность; вирулентность для мышей.

**Для цитирования:** Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Шилов А.А., Баланова М.А., Артемов Е.К., Куц А.А., Масалова О.В., Климова Р.Р., Гребенникова Т.В., Каверин Н.В. Изменение фенотипических свойств эскейп-мутантов и реадaptантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 под воздействием селекционированных мутаций в молекуле гемагглютинаина. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(2):73-78.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-73-78>

Timofeeva T.A.<sup>1</sup>, Rudneva I.A.<sup>1</sup>, Shilov A.A.<sup>1</sup>, Balanova M.A.<sup>1</sup>, Artemov E.K.<sup>1</sup>, Kushch A.A.<sup>1</sup>, Masalova O.V.<sup>1</sup>, Klimova R.R.<sup>1</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1,2</sup>, Kaverin N.V.<sup>1</sup>

## CHANGE OF PHENOTYPIC PROPERTIES OF ESCAPE MUTANTS AND READAPTANTS OF INFLUENZA VIRUS A (H1N1) pdm09 UNDER THE INFLUENCE OF SELECTED MUTATIONS IN THE MOLECULE OF HEMAGGLUTININ

<sup>1</sup>Ivanovsky Institute of Virology «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>Peoples Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, 117198, Russian Federation

**Introduction.** After the emergence and spread of pandemic H1N1 viruses in 2009, antigenic epitopes recognized by neutralizing antibodies against the hemagglutinin of influenza A/Moscow/01/09(H1N1)pdm09 viruses were studied. **Targets and goals.** The purpose of the study was to obtain readapted variants of the virus from a low-virulent escape-mutant that has an increased affinity of the avian and the human types cellular receptors compared to the wild type and the comparative study of their antigenic and receptor specificity. **Material and methods.** Viruses were accumulated in 10-day-old chicken embryos. The MAB panel against HA of influenza virus strain A/IIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 was used in the form of ascites fluids from mice. Immunization of mice, HI testing, elution of viruses from chicken erythrocytes, PCR and sequencing of readapted variants were performed by standard methods. **Results.** The amino acid substitution A198E acquired in the process of readaptation leads to changes in the antigenic specificity. A correlation was found between a decrease in virulence of a low-virulent escape mutant associated with the substitution D190N in the hemagglutinin molecule and an increase in the hemagglutinating titer to inhibitors in normal mouse serum. Viruses

**Для корреспонденции:** Тимофеева Татьяна Анатольевна, канд. биол. наук, руководитель лаборатории физиологии вирусов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

with low affinity of cellular receptor analogs and carrying amino acid substitutions have an increased ability to elute from chicken erythrocytes. **Discussion.** The results discuss the effect of mutations in the HA molecule of the influenza A(H1N1) pdm09 virus to the change in antigen specificity; virulence for mice, adsorption-elution at cellular receptors. **Conclusion.** A comparative study of the antigenic specificity and receptor-binding activity of the escape mutants was conducted for the hemagglutinin of the influenza virus A/Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, and the readapted variants obtained for one of the escape mutants with reduced virulence for mouse. Monitoring the pleiotropic effect of mutations in the hemagglutinin H1 molecule is necessary to predict variants of the virus with pandemic potential.

**Keywords:** influenza virus A (H1N1) pdm09; hemagglutinin H1; amino acid substitutions; antigen specificity; receptor-binding activity; virulence for mice.

**For citation:** Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Shilov A.A., Balanova M.A., Artemov E.K., Kushch A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Grebennikova T.V., [Kaverin N.V.] Change of phenotypic properties of escape mutants and readaptants of influenza virus A (H1N1)pdm09 under the influence of selected mutations in the molecule of hemagglutinin. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2): 73-78. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-73-78>

**For correspondence:** Tatiana A. Timofeeva: P.D., head of laboratory, Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician NF Gamaleya». E-mail: [timofeeva.tatyana@inbox.ru](mailto:timofeeva.tatyana@inbox.ru)

**Information about authors:**

Timofeeva T.A., <http://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>

Klimova R.R., <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>

Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Acknowledgment.** The publication was prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100».

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

Received 01 October 2018

Accepted 31 October 2018

Вирус гриппа А, вызывающий локальные вспышки, эпизоотии, сезонные эпидемии, а также глобальные пандемии с высокой смертностью по всему миру, является одним из наиболее распространённых патогенных возбудителей заболеваний человека и животных [1]. Эпидемия гриппа, охватившая в 2009 г. почти все страны и получившая, по решению ВОЗ, статус пандемии, была вызвана новым вариантом вируса гриппа А подтипа H1N1, возникшим в результате реассортации двух вирусов свиней – классического североамериканского и европейского [2]. В 2009 г. был выделен первый штамм пандемии в Российской Федерации, названный A/PIV-Moscow/01/2009(H1N1)sw1 [3]. Пандемический вирус гриппа появился на фоне сезонной активности эпидемических штаммов и вытеснил их из циркуляции, став доминирующим. Новый вирус резко отличался по антигенным свойствам от циркулировавшего в предшествующие годы вируса гриппа А подтипа H1N1. После появления и распространения пандемического вируса H1N1 2009 г. нами было проведено исследование антигенных эпитопов [4], распознаваемых вируснейтрализующими антителами против гемагглютинаина (НА) вируса гриппа A/Moscow/01/09(H1N1) pdm09. При этом дополнительно были выявлены фенотипические эффекты аминокислотных замен в НА, обеспечивающих резистентность к моноклональным антителам, такие, как изменения аффинности к аналогам клеточных рецепторов. Сопоставление аминокислотных замен у эскейп-мутантов, полученных к НА штамма A/PIV-Moscow/01/2009(H1N1)sw1 с заменами в гемагглютинине подтипа H1 природных изолятов указывало на роль ослабления сродства к клеточным рецепторам как на фактор, ограничивающий антигенный дрейф [5].

**Цель работы** – получение реадaptированных вариантов вируса из низковирулентного эскейп-мутанта,

обладающего повышенной аффинностью к клеточным рецепторам как «птичьего» (Neu5Ac2-3Gal), так и «человечьего» (Neu5Ac2-3Gal) типа по сравнению с диким типом [4], и сравнительное изучение их антигенной и рецепторной специфичности.

### Материал и методы

**Вирусы.** Высокопродуктивный штамм-реассортант ReM8, содержащий гены НА и нейраминидазы (NA) пандемического вируса 2009 г. A/PIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 и 6 генов вируса A/Puerto Rico/8/34(H1N1), был ранее использован нами для селекции эскейп-мутантов [4, 6, 7], так как обладал большей продуктивностью, чем вирус-родитель A/PIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1. Селекция 14 эскейп-мутантов (7 эскейп-мутантов первого поколения и 7 второго поколения), использованных в настоящем исследовании, описана в нашей предыдущей работе [4]. Два реадaptанта RAm 10G2(6)1 и RAm 10G2(6)3 были получены в настоящем исследовании от низко вирулентного эскейп-мутанта m10G2(6) путем 7-кратного серийного пассирования в легких мышей с последующим 5-кратным клонированием методом предельных разведений в куриных эмбрионах. Вирусы накапливали в 10-дневных куриных эмбрионах заражением в аллантаоисную полость с множественностью 1000 ЭИД<sub>50</sub> на эмбрион. Зараженные куриные эмбрионы инкубировали в течение 48 ч при 37 °С, после чего охлаждали в течение ночи при 4 °С. Вирусосодержащую аллантаоисную жидкость собирали, титровали в реакции гемагглютинации (РГА) и хранили при -80 °С.

**Моноклональные антитела (МКАТ).** Панель МКАТ против НА вируса гриппа подтипа H1 штамма A/PIV-Moscow/01/09(H1N1)sw1, включающая 6 МКАТ (1E7, 3D9, 5F7, 6A3, 3A3 и 10G2), ранее описана в работе [8].

МКАТ использовали в виде асцитных жидкостей мышей.

*Иммунизация мышей вирусом группа ReM8 (H1N1).* Мышам (белым, беспородным) массой тела 9–10 г вводили интраназально по 75 мкл вирусосодержащего материала в дозе 1000 ЭИД<sub>50</sub>/мышь под лёгким эфирным наркозом. На 21-й день после заражения у животных забирали кровь и приготавливали сыворотку.

*Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) с панелью МКАТ, поликлональной и нормальной мышинной сывороткой* проводили по стандартной методике, используя 0,75% суспензию куриных эритроцитов [9].

*Элюция вируса с куриных эритроцитов.* Способность вирусов элюировать с куриных эритроцитов была исследована, как описано ранее [10, 11]. К двукратным разведениям аллантаоисного вируса в 96-луночном планшете добавляли равный объем 0,5% суспензии куриных эритроцитов, инкубировали при 4 °С в течение 1 ч, после чего регистрировали гемагглютинирующий титр вируса (эффективность элюции оценивалась относительно этого титра). Далее планшеты инкубировали 5 ч при 37 °С, и каждый час в течение этого времени инкубации учитывали сохраняющийся гемагглютинирующий титр вируса.

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование реадaptированных вариантов.* Вирусную РНК выделяли из вирусосодержащей аллантаоисной жидкости с помощью набора «RNeasy Mini kit» (QIAGEN, Германия). Обратнo-транскриптазную реакцию и ПЦР проводили с праймерами, специфическими для генов вируса гриппа А. Продукты ПЦР очищали, используя набор «QIAquick PCR purification kit» (QIAGEN, Германия). ДНК секвенировали с помощью секвенатора DNA ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) и BigDye Terminator v3.1 kit. Нуклеотидные последовательности обрабатывали с помощью программы DNASTAR sequence analysis software package (DNASTAR Inc, США.).

### Результаты

В данном исследовании проанализировали фенотипические свойства 14 эскейп-мутантов и 2 реадaptированных вариантов вируса гриппа А(H1N1)pdm09,

которые содержали аминокислотные замены в различных областях молекулы HA. Мутации K156E, G158E, N159D и K163N располагаются в антигенном сайте Sa; мутации D190N, D190E, Q192L и A198E – в антигенном сайте Sb; мутации S210N и G228E – в рецептор-связывающем сайте; а мутация K285M находится в непосредственной близости от стержневого региона молекулы HA.

Как ранее показало параллельное титрование инфекционности на мышах и на куриных эмбрионах, эскейп-мутант m10G2(6) (D190N) обладал сниженной вирулентностью по сравнению с вирусом дикого типа ReM8 и вызывал гибель мышей только при инокуляции высокой дозы вируса [12]. Была предпринята попытка повысить вирулентность этого эскейп-мутанта посредством серийных пассажей в легких мышей при интраназальной инокуляции, т.е. провести его реадaptацию. Для первичного заражения мышей была использована вирусосодержащая аллантаоисная жидкость куриных эмбрионов, а для дальнейшего пассирования – осветленный гомогенат лёгочной ткани инфицированных мышей. При пассажах происходит селекция варианта, способного более активно размножаться в легких мышей, так что после серии пассажей вирус вызывает у мышей летальную лёгочную инфекцию. В итоге для низковирулентного эскейп-мутанта было получено 2 реадaptированных варианта. Последующее секвенирование генов HA реадaptированных вариантов показало, что оба реадaptированных варианта RAm 10G2(6)1 и RAm 10G2(6)3 сохранили аминокислотную замену D190N и приобрели дополнительную замену N133D, а вариант RAm 10G2(6)1 приобрел еще и дополнительно замену A198E (табл. 1).

Низковирулентный эскейп-мутант, селекционированный МКАТ 10G2, в перекрёстной РТГА не реагировал только с МКАТ, с помощью которого он был получен. Оба реадaptированных варианта RAm10G2(6)1 и RAm10G2(6)3, как и эскейп-мутант m10G2(6), не взаимодействовали с МКАТ 10G2. Реадaptант RAm10G2(6)3, так же как эскейп-мутант m10G2(6), реагировал со всеми остальными МКАТ использованной панели [8] – 1E7, 3D9, 5F7, 6A3 и 3A3, снижая при этом уровень связывания с

Таблица 1

Антигенная специфичность низковирулентного эскейп-мутанта и его реадaptированных вариантов в РТГА\*

Вирус	Аминокислотная замена	Титр МКАТ к A/Moscow/01/09(H1N1)sw1					
		1E7	3D9	5F7	6A3	3A3	10G2
ReM8	-	102 400**	102 400	51 200	102 400	102 400	51 200
m10G2(6)	D190N	25 600	12 800	25 600	51 200	25 600	<200
RAm 10G2(6)1	D190N, N133D, A198E	<200	<200	12800	<200	<200	<200
RAm 10G2(6)3	D190N, N133D	102 400	12 800	25 600	6400	25 600	<200

Примечание. \* Приведены данные одного из трех типичных экспериментов; \*\* приведены обратные величины титра МКАТ в РТГА. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

РТГА исследуемых вирусов с сыворотками мышей

Вирус	Аминокислотная замена	Титр* поликлональной мышшиной сыворотки к ReM8 (H1N1) с вирусами	Титр* нормальной мышшиной сыворотки с вирусами
ReM8	-	160**	128
m3D9(9)	K156E	160	128
m10G2(6)	D190N	80	512
m3D9(12)	K163N Q192L	80	16
m3A3(3)	N159D	320	128
m5F7(10)	G158E	320	64
m10G2(7)	D190N S210N	160	64
m3D9(9)-5F7(14)	K156E G158E	160	64
m3D9(9)-5F7(17)	K156E N129D	160	64
m5F7(10)-10G2	G158E D190N	160	128
m3A3(3)-10G2	N159D D190N	80	256
m6A3(5)-10G2	G158E D190E	80	256
m3A3(3)-5F7(28)	N159D N129S	80	64
m3A3(3)-5F7 (29)	G158E N159D	80	128
m10G2(12)	D190E G228E K285M	160	256
RAm 10G2(6)1	D190N N133D A198E	80	64
RAm 10G2(6)3	D190N N133D	80	64

Пр и м е ч а н и е. \* Приведены данные одного из трех типичных экспериментов; \*\* приведены обратные величины титра сывороток в РТГА.

МКАТ 6A3. Однако, реадaptант RAm10G2(6)1, несущий дополнительную замену A198E, сохранял реакцию только с одним антителом использованной панели – 5F7. Ранее нами установлено, что данное МКАТ направлено к консервативному эпитопу HA, тогда как остальные антитела опознают вариабельные эпитопы [13]. Таким образом, результаты перекрёстной РТГА полученных реадaptантов с панелью МКАТ показали, что приобретённая в процессе реадaptации аминокислотная замена в позиции 198 приводит к резким изменениям антигенной специфичности вируса (см. табл. 1).

Взаимодействие вируса гриппа с клеткой хозяина может тормозиться неспецифическими ингибиторами, которые присутствуют в нормальных сыворотках животных ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -ингибиторы). Аминокислотные замены в молекуле HA, сопровождающие адаптацию вируса гриппа к условиям репликации в легких мышей, могут способствовать приобретению резистентности к действию сывороточных ингибиторов [14–16]. В данном исследовании показано, что снижение вирулентности у эскейп-мутанта m10G2(6), ассоциированное с заменой D190N, коррелировало с увеличением гемагглютинирующего титра к ингибиторам в нормальной мышшиной сыворотке (табл. 2).

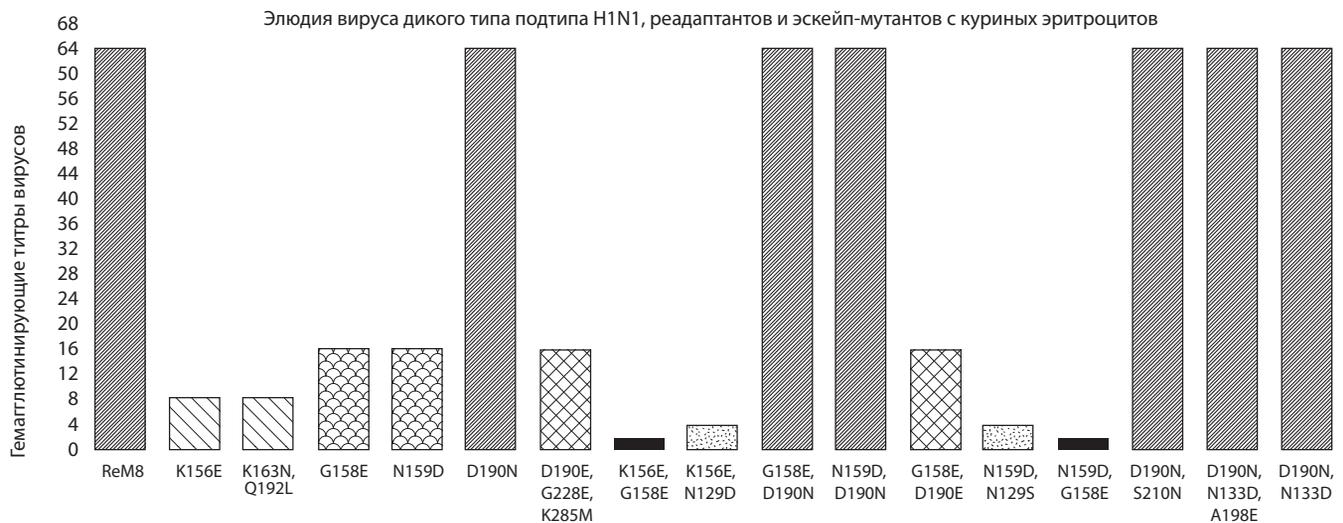
Высокая продуктивность использованного для получения эскейп-мутантов штамма-реассортанта ReM8, а также его иммуногенность, выявляемая в опытах иммунной защиты на мышах [6], дают возможность рассматривать вирус-реассортант ReM8 как штамм – кандидат для производства инактивированных и субъединичных вакцин против пандемического вируса гриппа [17]. В настоящем исследовании нами продемонстрировано (см. табл. 2), что даже по-

сле однократной иммунизации вирусом-родителем ReM8 уровень антител в поликлональной мышшиной сыворотке ко всем эскейп-мутантам и реадaptантам был аналогичен уровню антител к ReM8.

Ранее было показано, что высокая аффинность HA к сиаловым рецепторам затрудняет элюцию вируса с эритроцитов [10, 11]. На рисунке приведены гемагглютинирующие титры вирусов после 5 ч инкубации при 37 °C. Наиболее высокие значения титров соответствуют наименьшей скорости элюции. Выявлены различия в способности эскейп-мутантов элюировать с куриных эритроцитов, причем увеличение скорости элюции коррелировало с ослаблением способности эскейп-мутантов связываться с сиаловыми рецепторами [18]. Аминокислотная замена D190N у мутанта m10G2(6) не меняет скорость элюции по сравнению с вирусом дикого типа ReM8. Присутствие у реадaptантов (RAm 10G2(6)1, RAm 10G2(6)3) и эскейп-мутантов второго поколения (m5F7(10)-10G2, m3A3(3)-10G2) замены D190N восстанавливает медленную элюцию с куриных эритроцитов, свойственную соответствующему эскейп-мутанту первого поколения m10G2(6) [4]. Скорость элюции у реадaptантов, несущих замену D190N, не изменилась по сравнению со скоростями элюции у эскейп-мутанта m10G2(6) и вирусом дикого типа ReM8 (см. рисунок).

### Обсуждение

В данной работе проведено сравнительное изучение антигенной специфичности и рецепторсвязывающей активности эскейп-мутантов, полученных к HA вируса гриппа A/Moscow/01/2009(H1N1)sw1, и реадaptированных вариантов. Обнаружено, что при-



Изменение в степени элюции с куриных эритроцитов реадaptантов и эскейп-мутантов по сравнению с вирусом дикого типа подтипа H1N1\*.

\* После реакции гемагглютинации при 4 °C планшеты с вирусами инкубировали при 37 °C.

По оси ординат указаны обратные величины гемагглютинирующих титров вирусов после 5 ч инкубации при 37 °C. Наиболее высокие значения титров соответствуют наименьшей скорости элюции.

обретенная в процессе реадaptации аминокислотная замена A198E, расположенная в антигенном сайте Sb, приводит к изменениям антигенной специфичности, выявляемым в РТГА с панелью МКАТ к вирусу A/PV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1. Ранее нами было показано, что аминокислотные замены в позиции 198 восстанавливают вирулентность для мышей у низковирулентного эскейп-мутанта, полученного к HA вируса гриппа A подтипа H9 [19, 20]. По-видимому, аминокислотные замены в позиции 198 в структуре молекулы HA играют компенсаторную роль в усилении вирулентности вирусов гриппа A.

Авторы выявили корреляцию между снижением вирулентности у низковирулентного эскейп-мутанта, ассоциированным с заменой D190N в молекуле HA, и увеличением гемагглютинирующего титра к ингибиторам в нормальной мышинной сыворотке. Аналогичный эффект, связанный с заменой D126N, наблюдался ранее в работе, характеризующей эскейп-мутанты вируса гриппа подтипа H5 [21].

Показано, что варианты вируса с низкой аффинностью к аналогам клеточных рецепторов и несущие аминокислотные замены, которые приводят к снижению электростатического заряда поверхности молекулы HA, обладают повышенной способностью элюировать с куриных эритроцитов, и наоборот, эскейп-мутанты и реадaptированные варианты с высокой аффинностью элюируют медленнее.

Представленные в данной работе результаты демонстрируют влияние аминокислотных замен в молекуле HA вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на такие важные функциональные свойства вируса как изменение антигенной специфичности; вирулентность для мышей, коррелирующая с чувствительностью к

сывороточным ингибиторам; адсорбция-элюция на клеточных рецепторах, связанная с аффинностью к сиаозидам. Полученные сведения можно рассматривать как один из этапов фенотипической характеристики эскейп-мутантов и их реадaptированных вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Низкая встречаемость в природных изолятах вируса гриппа подтипа H1N1 мутаций, гомологичных тем, которые наблюдаются у лабораторных эскейп-мутантов и реадaptантов [12], указывает на ограничение антигенного дрейфа пандемического вируса A(H1N1)pdm09 и является следствием неблагоприятных фенотипических характеристик этих вирусных вариантов. Однако эволюционные процессы у вирусов гриппа A подтипа H1N1 подтверждают, что циркуляция этих вирусов в популяциях диких птиц может представлять постоянную потенциальную угрозу возникновения новых пандемических вариантов [22]. Мы полагаем, что мониторинг плеiotропного эффекта мутаций в молекуле гемагглютинина подтипа H1 необходим для прогнозирования вариантов вируса, обладающих пандемическим/эпидемическим потенциалом [23].

### Заключение

Обнаруженное в работе влияние мутаций в молекуле HA вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на фенотипические свойства вируса может способствовать выявлению в природных изолятах вирусных вариантов, обладающих эпидемическим потенциалом.

**Финансирование.** Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4, 7, 9-12, 19-22)  
СМ. REFERENCES

3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н. и др. Изоляция 24.05.09 и депонирование в государственную коллекцию вирусов (ГКВ 2452 от 24.05.09) первого штамма A/IV-Moscow/01/09 (H1N1)sw1, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 24.05.09 больного в Москве. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(5): 10-4.
5. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. Антигенная структура гемагглютинина вируса гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2012; (Прил. 1): 148-58.
6. Игнатьева А.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Шилов А.А., Забережный А.Д., Алипер Т.И. и др. Высокопродуктивный вирус-реассортант, содержащий гемагглютинин и нейраминидазу пандемического вируса гриппа A/Moscow/01/2009 (H1N1). *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(4): 9-14.
8. 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 A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, обладающие высокой вируснейтрализующей активностью. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(3): 15-20.
13. Масалова О.В., Чичев Е.В., Федякина И.Т., Мукашева Е.А., Климова Р.Р., Щелканов М.Ю. и др. Выявление консервативных и вариабельных эпитопов гемагглютинина штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с помощью моноклональных антител. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 34-40.
14. Шилов А.А., Синицын Б.В. Мутации в гемагглютинине, ассоциированные с приобретением вирусом гриппа устойчивости к  $\beta$ -ингибиторам сывороток животных. *Доклады Академии наук*. 1994; 334(4): 539-40.
15. Шилов А.А., Синицын Б.В. Изменения в гемагглютинине при адаптации вируса гриппа к мышам и их роль в приобретении вирулентных свойств и устойчивости к сывороточным ингибиторам. *Вопросы вирусологии*. 1994; 39(4): 153-7.
16. Шилов А.А., Синицын Б.В. Варианты вируса гриппа A H1N1, адаптированные к легким мышам и ингибиторам сыворотки крови мышам, различаются по свойствам и структуре гемагглютинина. *Вопросы вирусологии*. 2000; 45(3): 16-9.
17. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Шилов А.А., Игнатьева А.В. Реассортант ReM8 – вакцинный штамм вируса гриппа A подтипа H1N1. Патент РФ №2457245; 2012.
18. Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В., Руднева И.А., Мочалова Л.В., Бовин Н.В., Каверин Н.В. Влияние мутаций, меняющих антигенную специфичность, на рецепторсвязывающую активность гемагглютинина вирусов гриппа A подтипов H1 и H5. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 24-7.
23. Тимофеева Т.А., Асатрян М.Н., Альтштейн А.Д., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Прогнозирование эволюционной изменчивости вируса гриппа A. *Acta Naturae*. 2017; 9(3): 51-8.
7. Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Rudneva I.A., Shilov A.A., Kaverin N.V. Yields of virus reassortants containing the HA gene of pandemic influenza 2009 virus. *Acta Virol*. 2012; 56(2): 149-51.
8. Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., et al. Monoclonal antibodies with high virus-neutralizing activity against pandemic influenza virus A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(3): 15-20. (in Russian)
9. Palmer D.F., Dowdle W.R., Colman M.T., Schield G.C. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. In: *U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Immunology Series no. 6. Centers for Disease Control*. Atlanta, GA; 1975.
10. Wagner R., Wolff T., Herwig A., Pleschka S., Klenk H. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol*. 2000; 74(14): 6316-23. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6316-6323.2000>
11. Imai H., Shinya K., Takano R., Muramoto Y., Sakabe S., et al. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog*. 2010; 6(9): e1001106. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001106>
12. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Mukasheva E.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Burtseva E.I., et al. Pleiotropic effects of hemagglutinin amino acid substitutions of influenza A(H1N1)pdm09 virus escape mutants. *Virus Res*. 2018; 251: 91-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.002>
13. Masalova O.V., Chichev E.V., Fedyakina I.T., Mukasheva E.A., Klimova R.R., Shchelkanov M.Yu., et al. Detection of conservative and variable epitopes of the pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 hemagglutinin using monoclonal antibodies. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(3): 34-40. (in Russian)
14. Shilov A.A., Sinitsyn B.V. Mutations in haemagglutinin associated with acquisition by influenza virus of resistance to  $\beta$ -inhibitors of serums of animals. *Doklady Akademii nauk*. 1994; 334(4): 539-40. (in Russian)
15. Shilov A.A., Sinitsyn B.V. Mutations in hemagglutinin accompanying influenza virus adaptation to mice and their role in acquiring virulent properties and resistance to serum inhibitors. *Voprosy virusologii*. 1994; 39(4): 153-7. (in Russian)
16. Shilov A.A., Sinitsyn B.V. Influenza virus A (H1N1) variants adapted to mouse lungs and blood serum resistant to  $\beta$ -inhibitors of mouse serum differ by biological properties and hemagglutinin structure. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(3): 16-9. (in Russian)
17. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Ignat'eva A.V. Reassortant ReM8 – vaccine strain of influenza A virus subtype H1N1. Patent RF №2457245; 2012. (in Russian)
18. Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V., Rudneva I.A., Mochalova L.V., Bovin N.V., Kaverin N.V. Effect of mutations changing the antigenic specificity on the receptor-binding activity of the influenza virus hemagglutinin of H1 and H5 subtypes. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(1): 24-7. (in Russian)
19. Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Timofeeva T.A., Webster R.G., Kaverin N.V. Restoration of virulence of escape mutants of H5 and H9 influenza viruses by their readaptation to mice. *J. Gen. Virol*. 2005; 86(Pt. 10): 2831-8. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81185-0>
20. Ilyushina N.A., Rudneva I.A., Khlenkov A.M., Timofeeva T.A., Krylov P.S., Webster R.G., et al. Readaptation of a low-virulence influenza H9 escape mutant in mice: the role of changes in hemagglutinin as revealed by site-specific mutagenesis. *Arch. Virol*. 2010; 155(1):107-10. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0535-1>
21. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Varich N.L., Lipatov A.S., Smirnov Y.A., et al. Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J. Gen. Virol*. 2002; 83(Pt. 10): 2497-505.
22. Kocer Z., Carten R., Wu G., Zhang J., Webster R.G. The genomic contributions of avian H1N1 influenza A viruses to the evolution of Mammalian strains. *Plos One*. 2015; 10(7): e0133795. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133795>
23. Timofeeva T.A., Asatryan M.N., Al'tsheteyn A.D., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L. Predicting the Evolutionary Variability of the Influenza A Virus. *Acta Naturae*. 2017; 9(3): 51-8. (in Russian)

## REFERENCES

Поступила 01.10.18

Принята в печать 31.10.18