

- 1950–1957 and 1977–1983: two pathways from one gene. *Virology*. 1986; 148: 257–87.
15. L'vov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bogdanova V.S., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V. et al. A possible association of fatal pneumonia with mutations of pandemic influenza A/H1N1swl virus in the receptor-binding site of the HA1 subunit. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (4): 4–9. (in Russian)
16. L'vov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shlyapnikova O.V., Poglazov A.B. et al. Detection of amino acid substitutions of asparaginic acid for glycine and asparagine at the receptor-binding site of hemagglutinin in the variants of pandemic influenza A/H1N1 virus from patients with fatal outcome and moderate form of the disease. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (3): 15–9. (in Russian)
17. Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., De Marco M.A., Calzoletti L., Zanetti A. et al. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1)2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16 (5): 863–5.
18. Rogers G.N., Paulson J.C., Daniels R.S., Skehel J.J., Wilson I.A., Wiley D.C. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*. 1983; 304 (5921): 76–8.
19. Valli M.B., Selleri M., Meschi S., Zaccaro P., Vincenti D., Lalle E. et al. Hemagglutinin 222 variants in pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (4): 749–51.
20. WHO. Preliminary review of D222G amino acid substitution in hemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. WHO Report 28 December 2009. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_d222g/en/index.html.
21. Flu News Europe. World Health Organization. Available at: <http://flunewseurope.org>.
22. Centers for Disease Control and Prevention (CDC & P). Atlanta, USA. Weekly U.S. Influenza Surveillance Report. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm>.
23. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016–2017 northern hemisphere. Available at: <http://www.who.int/wer/2016/wer9110.pdf?ua=1>.
24. Zoonotic influenza viruses: antigenic and genetic characteristics and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. Available at: <http://www.who.int/wer/2016/wer9111.pdf?ua=1>.
25. Chuchalin A.G. Influenza: lessons of pandemic (clinical aspects). *Pulmonology*. 2010; Suppl. 1: 3–8. (in Russian)

Поступила 20.03.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.921.5-06:616.24-002-0221-036.88-091.8

Краснободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Щелканов М.Ю., Дерябин П. Г.

ПОЛИМОРФИЗМ АМИНОКИСЛОТ В ПОЗИЦИИ 222 РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩЕГО САЙТА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А (H1N1)PDM09 У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕТАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В 2012–2014 гг.

Институт вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Представлены данные исследования секционного материала от пациентов, погибших от пневмонии, ассоциированной с вирусом гриппа А (H1N1)pdm09, в 2012–2014 гг., на наличие мутантных (позиция 222 в рецепторсвязывающем сайте гемагглютинина (НА)) форм вируса. Всего, по совокпным данным, полученным тремя различными методами (секвенирование, next-generation sequencing (NGS), изоляция вируса), мутантные варианты вируса выявлены у 17 (41%) из 41 пациента. Доля мутантных форм в составе вирусной популяции колебалась от 1 до 69,2%. Наиболее часто встречалась смесь дикого (D222) и мутантного (D222G) варианта, доля которого варьировала от 3,3 до 69,2% вирусной популяции. Реже в смеси обнаруживалась мутация D222N (от 1,1 до 5,5%). У одного из пациентов состав вирусной популяции был крайне неоднороден. Так, если в образце левого легкого выявлен только дикий тип D222, в правом легком обнаружена смесь вариантов 222D/G/N (65,4/32,5/1,1%), в трахее – смесь 222D/G/Y/A (61,8/35,6/1,2/1,4% соответственно). В бронхах данного пациента выявлена смесь 222D/G/N/A (64,3/33,7/1/1% соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс адаптации вируса в нижних отделах респираторного тракта сопряжен с появлением различных вариантов вируса с мутациями в рецепторсвязывающем сайте НА. Образование мутантных форм вируса в тканях нижнего отдела респираторного тракта, видимо, приводит в большинстве случаев к вирусной летальной пневмонии. Однако если они представляют минорную часть популяции, их не удается выявить методом конвекционного секвенирования, но они могут быть обнаружены с помощью метода NGS.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *грипп; гемагглютинин; А (H1N1)pdm09; next-generation sequencing; рецепторная специфичность; рецепторсвязывающий регион; α2–3-сиалозиды; вирусная пневмония.*

Для цитирования: Краснободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л. В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Оскерко Т.А., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г. Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинина вируса гриппа А (H1N1)pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией в 2012–2014 гг. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4): 166–171.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-166-171

Для корреспонденции: Краснободцев Кирилл Геннадьевич, науч. сотр. лаб. этиологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: kkg_87@mail.ru

Krasnoslobodtsev K.G., Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kolobukhina L.V., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Oskerko T.A., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G.

AMINO ACID POLYMORPHISM AT RESIDUE 222 OF THE RECEPTOR-BINDING SITE OF THE HEMAGGLUTININ OF THE PANDEMIC INFLUENZA A(H1N1)PDM09 FROM PATIENTS WITH LETHAL VIRUS PNEUMONIA IN 2012-2014

D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Survey data from autopsy specimens from patients who died from pneumonia caused by the influenza A(H1N1) pdm09 in 2012-2014 and mutant forms of influenza virus in these patients (position 222 in the receptor-binding region of hemagglutinin) were presented. In total, according to aggregate data, obtained with three different methods (sequencing, next-generation sequencing (NGS), virus isolation) mutant viruses were detected in 17 (41%) from 41 patients. The proportion of the mutant forms in viral populations ranged from 1% to 69.2%. The most frequent mixture was the wild type (D222) and mutant (D222G), with proportion of mutant type ranged from 3.3% to 69.2% in the viral population. Mutation D222N (from 1.1% to 5.5%) was found rarely. Composition of the viral population from one patient is extremely heterogeneous: in left lung there was only wild type D222, meantime in right lung – mixture of mutant forms 222D/N/G (65.4/32.5/1.1%), in trachea – mixture 222D/G/Y/A (61.8/35.6/1.2/1.4%, respectively), and in bronchi compound of 222D/G/N/A (64.3/33.7/1/1%, respectively) were detected. The obtained data indicate that the process of adaptation of the virus in the lower respiratory tract is coupled with the appearance of different virus variants with mutations in the receptor-binding region. Mutant forms of the virus are observed in the lower respiratory tract of the majority of patients with lethal viral pneumonia. However, if they are a minor part of the population, they cannot be detected by the method of conventional sequencing. They can be identified using the NGS methods.

Key words: influenza; hemagglutinin; A(H1N1)pdm09; next-generation sequencing; receptor specificity; receptor-binding site; α 2-3-sialosides; viral pneumonia.

For citation: Krasnoslobodtsev K.G., Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kolobukhina L.V., Kirillova E.S., Trushakova S.V., Oskerko T.A., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G. Amino acid polymorphism at residue 222 of the receptor-binding site of the hemagglutinin of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 from patients with lethal virus pneumonia in 2012-2014. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4):166-171. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-166-171

For correspondence: Kirill G. Krasnoslobodtsev, researcher of influenza etiology and epidemiology laboratory of D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: kkg_87@mail.ru

Information about authors:

Krasnoslobodtsev K.G., <http://orcid.org/0000-0003-1745-9128> Oskerko T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1290-2661>
Lvov D. K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582> Shchelkanov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-8610-7623>
Alkhovsky S.V., <http://orcid.org/0000-0001-6913-5841> Deryabin P. G., <http://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Funding. The work was supported by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. CoAg: U51P000527-02.

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

Received 15 January 2016

Accepted 26 January 2016

Введение

Появление в 2009 г. и широкое распространение нового антигенного варианта вируса гриппа А (H1N1) pdm09 изменили характер эпидемического процесса по долевого участию субтипов вируса гриппа, интенсивности подъёмов заболеваемости, вовлечению разных возрастных групп, заболеваемости и смертности. В эпидемические сезоны его активной циркуляции (2009–2010, 2010–2011, 2012–2013) регистрировали более высокие показатели заболеваемости среди взрослых, обострились проблемы тяжелого течения гриппозной инфекции у беременных, лиц с иммунологическими расстройствами и ожирением, нередко с летальными исходами [1–5].

С 2009 г. в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России проводится надзор за циркуляцией этого вируса, в том числе с целью изучения причинно-следственных связей тяжелых и летальных форм гриппозной инфекции с генетическими свойствами вируса гриппа А (H1N1) pdm09. Результаты, полученные в 2009–2011 гг., указывали на связь мутации D222G в рецепторсвязывающем сайте гемогглиутина вируса (HA1) с повышенной специфичностью к α 2–3-сиалозидам рецепторов эпителиальных клеток, выстилающих нижние отделы респираторного

тракта. При этом мутантные формы вируса были выявлены в тканях пациентов с тяжелой вирусной пневмонией с летальным исходом [1, 2, 6–9].

Особый интерес представляло определить возможное разнообразие структуры популяции вируса гриппа А (H1N1) pdm09 с аминокислотными заменами в позиции 222 HA в материале от пациентов с летальными исходами и возможную роль минорных вариантов в развитии тяжелого течения гриппозной инфекции и первичной летальной вирусной пневмонии.

В настоящей работе представлены результаты исследований материала от пациентов, погибших от тяжелой вирусной пневмонии, этиологически связанной с вирусом гриппа А (H1N1) pdm09, в 2012–2014 гг. В результате анализа мутации в позиции 222 в HA обнаружены у 41% пациентов (17 из 41). При этом в ряде случаев мутантные формы вируса, представляющие минорную часть вирусной популяции, были выявлены только при помощи метода next-generation sequencing (NGS). NGS-секвенирование обладает рядом преимуществ перед секвенированием предыдущего поколения, позволяя определять последовательности генома неизвестных возбудителей, а также предоставлять более точные данные о структуре популяции возбудителя, в том числе о минорных вариантах.

Материал и методы

Клинический материал и изоляция вируса гриппа А (H1N1)pdm09. В период 2012–2014 гг. получен аутопсийный материал (фрагменты легких, трахеи и бронхов) от 46 пациентов, у которых при жизни или посмертно был детектирован грипп А (H1N1)pdm09. Материалы для исследований были получены из Москвы, Твери, Брянска, Великого Новгорода, Владимира, Ярославля, Оренбурга, Майкопа, Екатеринбурга и Хабаровска. Пробы от 41 пациента исследовали молекулярно-генетическими и вирусологическими методами.

Из полученного секционного материала на куриных эмбрионах (КЭ) и клетках культуры ткани MDCK были изолированы 8 штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09. По антигенным свойствам штаммы оказались близкородственными эталону А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 и взаимодействовали с референс-сывороткой до 1/4–1 гомологичного титра.

Выделение суммарной РНК из секционного материала. Для выделения суммарной РНК из аутопсийного материала замороженные (–70°C) кусочки ткани в количестве около 50 мг были гомогенизированы с использованием гомогенизатора TissueLyser LT («Qiagen», Германия) в 1 мл реагента TRIzol («Invitrogen», США). Далее выделяли РНК в соответствии с инструкцией производителя. Полученный препарат РНК растворяли в 100 мкл воды. Для дополнительной очистки, а также удаления низкомолекулярных форм (5S рРНК, тРНК) РНК была очищена с помощью набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия).

Детекция РНК вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в секционном материале. Детекцию проводили методом ПЦР в реальном времени (прибор Rotor-Gene 6000HRM, «Corbet») с использованием лабораторного варианта тест-системы с праймерами (SWH1F GTGCTATAAACACCAGCCTYCCA, SWH1R CGG-GATATTCSTTAATCCTGTRGC, SWH1P) и зондом ((FAM)-CAGAATATACA(T-BHQ1)CCRTGCACAATTGGARAA), рекомендованными Центром по надзору за заболеваниями (CDC) в 2009 г. Синтез кДНК перед ПЦР выполняли с использованием универсального праймера 5'Upi(5'-AGCRAAAGCAGG-3'), комплементарного 3'-концевым последовательностям сегментов генома вирусов гриппа А, и обратной транскриптазы RevertAid Premium («Thermo Scientific», США). Для ПЦР использовали готовую двукратную ПЦР-смесь 2x SsoFast Supermix («Bio-Rad», США).

Участок гена НА, содержащий сайт связывания рецептора, был амплифицирован с использованием праймеров swH1_379F (5'-TGTA AACGACGGCCA GTACRTGTTACCCAGGRGATTTC-3') и H1sw_1138R (5'-TGACCCCTGCTCATTTTGATGG-3'). Для получения фрагментов использовали полимеразу Phusion («Thermo Scientific»), которая обладает высокой точностью синтеза. Если титр вируса в пробе был низким и фрагмент было невозможно получить в первом раунде ПЦР, проводили второй раунд амплификации с использованием праймеров swH1_379F и swH1_882R (5'-TGTA TTGCAATCGTGGACTGGTG-3'). Фрагменты визуализировали в 2% агарозном геле. Полученные ПЦР-фрагменты очищали набором QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen») для последующего секвенирования.

Секвенирование ПЦР-фрагментов. Реакцию секвенирования проводили с использованием набора Big-

Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 («Thermo Scientific») в соответствии с инструкцией. Продукты реакции очищали с помощью набора ZR DNA Sequencing Clean-up Kit («Zymo Research»). Электрофорез продуктов реакции секвенирования и их первичный анализ выполняли на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems») согласно рекомендациям производителя.

Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование. Для получения кДНК около 100 нг РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером при 85°C в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium («Thermo Scientific», США) и 20 ед. ингибитора RNase RNasin («Promega», США). Инкубировали при 25°C 10 мин, далее при 42°C 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70°C 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с использованием набора NEBNext[®] mRNA Second Strand Synthesis Module («NEB», США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали с использованием набора MinElute PCR Purification Kit («Qiagen», Германия) на автоматической станции QIAcube.

Для получения ДНК-библиотек из дцДНК использовали набор TruSeq DNA Sample Prep Kits v2 («Illumina», США) в соответствии с инструкцией. Для селекции ДНК по размеру применяли реагент AMPure XP («Beckman Coulter», США) с расчетом получения ДНК-библиотек длиной более 270 нуклеотидных оснований (н. о.), что соответствует размеру вставки около 150 н. о. Данные требования к размеру ДНК-библиотек связаны с использованием для секвенирования набора, позволяющего секвенировать не более 150 н. о. в одну сторону. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза QIAxcel Advanced System («Qiagen», Германия). Молярность библиотек измеряли методом ПЦР в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix («Bio-Rad», США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве *Sequencing Library qPCR Quantification Guide* («Illumina», США).

Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq («Illumina», США) с использованием набора MiSeq Reagent Kits v2 (300PE) в соответствии с инструкцией производителя.

Биоинформационный анализ. Анализ полученных данных полногеномного секвенирования проводили при помощи программного обеспечения CLC Genomics Workbench 7.0. Для анализа полученных последовательностей, их выравнивания и выявления мутаций использовали пакет программ DNASTAR-Lasergene v6.

Животные. В работе использовали белых беспородных мышей (самки) массой 10–12 г из питомника «Андреевка» (Московская область), которых содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Для инфицирования мышей использовали пандемический штамм вируса гриппа А/Калифорния/7/09 (H1N1)pdm09, адаптированный к мышам, полученный из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

Результаты

В период 2012–2014 г. на исследование в рамках надзора за циркуляцией вирусов гриппа поступил секционный материал от 46 пациентов, у которых у

прижизненном клиническом материале (носоглоточные смывы, бронхоальвеолярный лаваж) или секционном материале (ткань трахеи, бронхов, легкого) была выявлена РНК вируса гриппа А (H1N1)pdm09. Были получены и проанализированы последовательности рецепторсвязывающей области HA от 41 пациента, в том числе полученные из тканей трахеи (25 положительных образцов), бронхов (15 образцов), легких (56 образцов), а также смешанного пула бронхов и легких (2 образца) (табл. 1, 2).

Мутантные варианты вируса в секционном материале были найдены у 8 (19,5%) погибших пациентов из 41 (см. табл. 1). При этом чаще всего выявляли замену D222G (6 пациентов), тогда как замены D222N и D222Y были найдены в единичных случаях. Как правило, мутантные формы обнаруживали во всех образцах от одного пациента за исключением трех пациентов, у которых в различных тканях выявляли дикие или мутантные варианты (см. табл. 1).

Для более подробного анализа вирусной популяции в тканях погибших пациентов применен метод высокопроизводительного секвенирования NGS. Проанализированы 15 образцов (ткани легкого, бронхов или трахеи) от 7 пациентов. Все образцы, по данным конвекционного секвенирования (методом Сэнгера), имели дикий генотип D222. Однако результаты «глубокого секвенирования» показали, что у четырех из них в составе вирусной популяции присутствуют мутантные формы. Доля мутантных форм в вирусной популяции составляла от 1 до 69,2%. При этом наличие минорных мутантных вариантов вируса часто определяли только в части образцов от одного пациента. Так, мутантные формы могли быть обнаружены только в трахее или бронхах, тогда

как в тканях легкого определяли только дикий вариант (см. табл. 2). В таблице приведены данные только для пациентов, у которых были обнаружены мутантные варианты вируса.

Долевой состав минорных мутантных форм вируса в разных тканях также различался. Наиболее часто выявляли смесь дикого (D222) и мутантного (D222G) варианта, доля которого в вирусной популяции варьировала от 3,3 до 69,2%. Реже в смеси обнаруживали мутацию D222N (от 1,1 до 5,5% в составе популяции). У одного из пациентов (M27) состав вирусной популяции был крайне неоднороден. Так, если в образце левого легкого выявлен только дикий тип D222, в правом легком обнаружена смесь вариантов 222D/G/N (65,4/32,5/1,1%), в трахее – смесь 222D/G/Y/A (61,8/35,6/1,2/1,4% соответственно). В бронхах данного пациента выявлена смесь 222D/G/N/A (64,3/33,7/1/1% соответственно).

Из секционного материала в эпидемическом сезоне 2012–2013 гг. были изолированы 8 штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09 на культуре клеток MDCK или развивающихся КЭ. Штаммы выделены из секционного материала, в котором мутантных вариантов вируса при конвекционном секвенировании обнаружено не было. Из 8 изолированных штаммов 3 сохранили дикий генотип D222, а у 5 штаммов выявлена мутация D222G, причем 4 штамма имели смешанную популяцию 222D/G. Важно отметить, что при изоляции на клетках MDCK вируса гриппа А (H1N1)pdm09 из носоглоточных смывов мутантные варианты D222G практически не встречаются. Это свидетельствует о том, что их образование не связано с культивированием вируса на данном типе клеток [6, 10]. Однако высокая частота изоляции мутантных форм вируса из тканей респираторного тракта позволяет пред-

Таблица 1

Штаммы вируса гриппа А (H1N1)pdm09, выделенные из секционного материала (сезон 2012–2013), с указанием аминокислоты в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта HA

Пациент	Клинический материал	Штамм	Система выделения штамма, пассаж, титр, АЕ	Секвенирование штамма на MiSeq (HA 222)	Секвенирование секционного материала по Сэнгеру (HA 222)
R1	Трахея	A/IV-Orenburg/83/2012	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)/G (GGT)	D(GAT)
	Легкое				D(GAT)
R2	Левое легкое	A/IV-Orenburg/52/2013	MDCK, 3-й, 8	G (GGT)	D(GAT)
	Трахея Бронхи				D(GAT) D(GAT)
YA2	Левое легкое	A/IV-Yaroslavl/96/2013	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)	D(GAT)
	Правое легкое		Штамм не выделен		Y(TAT)
MP_1	Левое легкое	A/IV-Maykop/97/2013	MDCK, 1-й, 32	D(GAT)	н. д.
MP_2	То же	A/IV-Maykop/116/2013	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)/G (GGT)	н. д.
H1	Трахея		Штамм не выделен		D(GAT)
	Бронхи	A/IV-Chabarovsk/98/2013	MDCK, 2-й, 32	D(GAT)/G (GGT)	D(GAT)
E3	Легкое		Штамм не выделен		D(GAT)
	Трахея	A/IV-Yekaterinburg/107/2013	MDCK, 2-й, 8	D(GAT)	D(GAT)
M21	Тимус				D(GAT)
	Левое легкое		Штамм не выделен		D(GAT)
	Правое легкое		То же		D(GAT)
	Трахея		" "		D(GAT)
	Бронхи	A/IV-Moscow/115/2013	КЭ, 2-й, 16	D(GAT)/G (GGT)/N (AAT)	D(GAT)

Примечание. Здесь и в табл. 2: н. д. – нет данных.

Таблица 2

Обнаружение мутантных форм вируса А (H1N1)pdm09 по позиции 222 HA в секционном материале от пациентов с летальной пневмонией в 2012–2014 гг.

Сезон	Пациент	Материал	Полиморфизм по 222 HA, %				
			D	G	N	Y	A
2012–2013	M7	Правое легкое	-	-	+	-	-
		Левое легкое	-	-	+	-	-
	M15	Правое легкое	+	-	-	-	-
		Левое легкое	-	+	-	-	-
		Трахея	-	+	-	-	-
		Бронхи	+	-	-	-	-
	H2	Легкое	-	+	-	-	-
		Трахея	+	-	-	-	-
		Бронхи	-	+	-	-	-
	P1	Трахея	-	+	-	-	-
		Легкое	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
	YA2	Правое легкое	+	-	-	-	-
		Левое легкое	-	-	-	+	-
	R2	Левое легкое	100	0	0	0	0
		Трахея	30,8	69,2	0	0	0
		Бронх	95,5	4,5	0	0	0
	M21	Трахея	96,7	3,3	0	0	0
		Бронх	80,8	13,7	5,5	0	0
H7	Бронхи	-	+	-	-	-	
	Легкое	-	+	-	-	-	
M27	Левое легкое	100	0	0	0	0	
	Правое легкое	65,4	32,5	1,1	0	2	
	Трахея	61,8	35,6	0	1,2	1,4	
	Бронх	64,3	33,7	1	0	1	
2013–2014	L1	Легкое	100	0	0	0	0
		Трахея	100	0	0	0	0
	V1	Легкое	100	0	0	0	0
		Бронхи, легкое	-	+	-	-	-
	V4	Легкое	100	0	0	0	0
		Трахея	72,5	27,5	0	0	0
	V5	Легкое	100	0	0	0	0
		Легкое	-	+	-	-	-

Примечание. Серым цветом выделены образцы, исследованные методом глубокого секвенирования (NGS). Остальные образцы исследованы конвекционным секвенированием по методу Сэнгера. Обнаружение или отсутствие аминокислоты в образце методом конвекционного секвенирования указаны знаками «+» и «-» соответственно. н. д. – нет данных.

положить, что при культивировании вируса на клетках MDCK происходит отбор мутантных вариантов 222G, которые присутствовали в вирусной популяции в минорном количестве. Таким образом, можно сделать вывод, что образование мутантных форм вируса в тканях нижнего отдела респираторного тракта происходит в

большинстве случаев при тяжелой вирусной пневмонии, но если они представляют минорную часть популяции, их не удастся выявить методом конвекционного секвенирования. Решить эту проблему позволяет применение метода NGS. По данным, полученным в ходе исследования, число пациентов, у которых были обнаружены мутантные формы вируса, составило 17 (41%) из 41.

Обсуждение

Ранее было показано, что ряд штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09, ассоциированных с летальными случаями, часто несет мутацию в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта HA. Замены D222G/N/E предположительно повышают сродство вируса к $\alpha 2$ -3-рецепторам, что в свою очередь повышает эффективность репликации вируса в нижних отделах респираторного тракта [1, 2, 6–8, 11–13]. Так, мутация D222G приводит к разрыву солевого мостика между D222 и K219 и ослаблению петли 220, открывая ключевой доступ для связывания с $\alpha 2$ -3-рецепторами [14]. *In vitro* мутация D222G приводила к усилению связывания вируса с клетками тканевого нижнего отдела респираторного тракта человека, в частности с макрофагами и пневмоцитами II типа в альвеолах, а также с железистыми клетками в трахее и бронхах [15]. Кроме того, мутантный вариант D222G усиливал вирулентность вируса А (H1N1)pdm09 для мышей [14].

Учитывая полученные данные, можно сделать вывод, что процесс адаптации вируса в нижних отделах респираторного тракта сопряжен с появлением различных вариантов вируса с мутациями в рецепторсвязывающем сайте HA. Этот процесс, вероятно, лежит в основе отбора наиболее адаптированных к репликации в определенных тканях вариантов, что способствует более тяжелому течению вирусной пневмонии. Таким образом, примененный метод глубокого секвенирования позволил выявить мутантные варианты вируса, представляющие минорную часть вирусной популяции.

Процесс адаптации вируса гриппа А (H1N1)pdm09 к тканям нижних отделов респираторного тракта был изучен на модели летальной пневмонии у мышей. Для моделирования данного процесса использовали штамм A/California/7/2009, адаптированный к мышам в течение 5 пассажей. Адаптированный вариант вируса пассировали на КЭ и использовали для заражения мышей. Результаты анализа генома адаптированного варианта вируса, проведенного методом NGS, показали, что он имеет дикий генотип 222D, но в соседней позиции выявлена мутация Q223R. Q223R часто выявляется у вирусов А (H1N1)pdm09, культивируемых на КЭ, и отражает его адаптацию к данной модели [16]. Однако при анализе вируса, выделенного из тканей легкого мышей, зараженных адаптированным вирусом, были выявлены смеси диких и мутантных форм 222D/G (82 и 18% соответственно) и 223R/Q (81 и 19% соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс адаптации вируса к тканям легких человека и мышей имеет схожий механизм, связанный с формированием мутантных вариантов в позиции 222. Таким образом, наши данные указывают на то, что мутантные варианты вируса гриппа А (H1N1)pdm09 появляются непосредственно в нижних отделах респираторного тракта. Следовательно, в процессе инфекции в верхних и нижних отделах респираторного тракта формируются две различные вирусные популяции. В верхних отделах респираторного тракта мутантные варианты вируса

практически не выявляются, вследствие чего затрудняется их передача от человека к человеку в ходе эпидемического процесса [17, 18]. Важно отметить, что в активной циркуляции мутантные формы в чистом виде не встречаются и всегда присутствуют только вместе с диким типом вируса [18]. Появление мутантных форм вируса, обладающих повышенным сродством к $\alpha 2$ -3-рецепторам, может являться одним из факторов, способствующих возникновению и более тяжелому течению пневмонии при данной форме гриппа.

Финансирование. Исследование было частично финансировано Центром по контролю и предотвращению заболеваний, Атланта, США, договор CoAg: U51P000527-02.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5, 8, 9, 11–18 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа A/H1N1sw1 в рецепторсвязывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютини-на. *Вопросы вирусологии*. 2010; (4): 4–9.
2. Львов Д.К., Малышев Н.А., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. и др. *Грипп, вызванный новым пандемическим вирусом A/H1N1sw1: клиника, диагностика, лечение. Методические рекомендации*. М.; 2009.
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа A (H1N1)v в России. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55 (3): 4–9.
6. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чучалин 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): 14–7.
7. Львов Д.К., Яшкульов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Шляпникова О.В. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютини-на в вариантах пандемического вируса гриппа A/H1N1 от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55 (3): 15–9.
10. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И., Гудкова Т.М., Литвинова О.М. и др. *Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Методические рекомендации*. М.; 2006.
4. Gilca R., De Serres G., Boulianne N., Ouhoumane N., Papenburg J., Douville-Fradet M. et al. Risk factors for hospitalization and severe outcomes of 2009 pandemic H1N1 influenza in Quebec, Canada. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2011; 5 (4): 247–55.
5. Laura G.M., Sonja A.R., Denise J.J. 2009 pandemic influenza A (H1N1) in pregnancy: a systematic review of the literature. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011; 205 (1): 10–8.
6. L'vov 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): 14–7. (in Russian)
7. L'vov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Shlyapnikova O.V. et al. Detection of amino acid substitutions of asparaginic acid for glycine and asparagine at the receptor-binding site of hemagglutinin in the variants of pandemic influenza A/H1N1 virus from patients with fatal outcome and moderate form of the disease. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (3): 15–9. (in Russian)
8. Ruggiero T., Rosa F., Cerutti F., Pagani N., Allice T., Stella M.L. et al. A (H1N1) pdm09 hemagglutinin D222G and D222N variants are frequently harbored by patients requiring extracorporeal membrane oxygenation and advanced respiratory assistance for severe A (H1N1) pdm09 infection. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2013; 7 (6): 1416–26.
9. Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawakawa Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006; 440 (7083): 435–6.
10. Sominina A.A., Burtseva E.I., Lobova T.G., Koновалова N.I., Gudkova T.M., Litvinova O.M. et al. *Virus Isolation on Cell Culture and Chicken Embryos and their Identification. Guidelines [Vydelenie virusov grippa v kletochnykh kul'turakh i kurinykh embrionakh i ikh identifikatsiya. Metodicheskie rekomendatsii]*. Moscow; 2006. (in Russian)
11. Chunli W., Xiaowen C., Xin W., Xing L., Fan Y., Tao L. et al. Clinical and molecular characteristics of the 2009 pandemic influenza H1N1 infection with severe or fatal disease from 2009 to 2011 in Shenzhen, China. *J. Med. Virol.* 2013; 85 (3): 405–12.
12. Zehender G., Pariani E., Piralla A., Lai A., Gabanelli E., Rangihero A. et al. Reconstruction of the evolutionary dynamics of the A (H1N1) pdm09 influenza virus in Italy during the pandemic and post-pandemic phases. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e47517.
13. Kong W., Liu L., Wang Y., Gao H., Wei K., Sun H. et al. Hemagglutinin mutation D222N of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus alters receptor specificity without affecting virulence in mice. *Virus Res*. 2014; 189: 79–86.
14. Zhang W., Shi Y., Qi J., Gao F., Li Q., Fan Z. et al. Molecular basis of the receptor binding specificity switch of the hemagglutinins from both the 1918 and 2009 pandemic influenza A viruses by a D225G substitution. *J. Virol.* 2013; 87 (10): 5949–58.
15. Chutinimitkul S., Herfst S., Steel J., Lowen A.C., Ye J., van Riel D. et al. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus affects receptor binding. *J. Virol.* 2010; 84 (22): 11 802–13.
16. Chen Z., Wang W., Zhou H., Suguitan A.L., Shambaugh C., Kim L. et al. Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. *J. Virol.* 2009; 84 (1): 44–51.
17. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010. *Euro Surveill*. 2010; 15 (9): pii: 19498.
18. Wedde M., Wählisch S., Wolff T., Schweiger B. Predominance of HA-222D/G polymorphism in influenza A (H1N1)pdm09 viruses associated with fatal and severe outcomes recently circulating in Germany. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e57059.

Поступила 15.01.16

Принята в печать 26.01.16