

Е.С.Кострюкова<sup>1</sup>, Н.Б.Захаржевская<sup>1</sup>, П.А.Костин<sup>1</sup>, Е.Н.Ильина<sup>1</sup>, А.К.Ларин<sup>1</sup>, О.Г.Грибанов<sup>1</sup>, О.В.Селезнева<sup>1</sup>,  
Е.А.Приходько<sup>1</sup>, Т.А.Акопиан<sup>1</sup>, Э.В.Генерозов<sup>1</sup>, В.Н.Лазарев<sup>1,2</sup>, С.А.Левицкий<sup>1,2</sup>, И.Г.Кондратов<sup>1</sup>, Д.Г.Алексеев<sup>1</sup>,  
Н.А.Базалеев<sup>1</sup>, Е.А.Климова<sup>3</sup>, М.Р.Есаулова<sup>4</sup>, Н.Д.Юшук<sup>3</sup>, В.М.Говорун<sup>1,2,5</sup>, В.И.Сергиенко<sup>1</sup>

## Генетический анализ вируса гриппа А / H1N1 "пандемический" в условиях эпидемии

1 – ФГУ "НИИ физико-химической медицины" ФМБА России: 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а;

2 – УРАН "Институт биоорганической химии РАН": 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16 / 10;

3 – ГОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет" Росздрава: 103473, Москва, ул. Делегатская, 20 / 1;

4 – ГУЗ г. Москвы "Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗ г. Москвы": 125367, Москва, Волоколамское ш., 63;

5 – ФГУ "РНИИ "Курчатовский институт": 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

*E.S.Kostryukova, N.B.Zakharzhetskaya, P.A.Kostin, E.N.Ilyina, A.K.Larin, O.G.Gribanov, O.V.Selezneva, E.A.Prikhodko, T.A.Akopian, E.V.Generozov, V.N.Lazarev, S.A.Levitsky, I.G.Kondratov, D.G.Alexeev, N.A.Bazaleev, E.A.Klimova, M.R.Esaulova, N.D.Yushchuk, V.M.Govorun, V.I.Sergienko*

## Genetic analysis of pandemic influenza A / H1N1 virus during epidemic

**Key words:** influenza A / H1N1 virus, pandemic, resistance to oseltamivir, human genetic polymorphism, polygenomic sequencing of viral genomes.  
**Ключевые слова:** вирус гриппа А / H1N1 "пандемический", устойчивость к осельтамивиру, генетические полиморфизмы человека, полногеномное секвенирование вирусных геномов.

Первые сообщения о вспышке нового вируса, в дальнейшем идентифицированного как вирус гриппа А / H1N1 "пандемический" (ВГ А / H1N1 "пан"), появились в апреле 2009 г. [1, 2]. Он представлял собой вариант сезонного вируса гриппа А / H1N1 и характеризовался высокой контагиозностью. Это привело к объявлению пандемии вируса гриппа Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Центром по контролю и профилактике заболеваний США в июне 2009 г. [3].

Механизм действия ВГ А / H1N1 "пан" на организм человека аналогичен таковому при поражении другими штаммами вируса гриппа [4, 5]. Главным звеном в патогенезе является поражение сосудистой системы, приводящее к нарушениям микроциркуляции и застою полнокровию внутренних органов. В свою очередь, это ведет к развитию отека легочной ткани с множественными кровоизлияниями в альвеолы и интерстиций [6]. Отличительной особенностью развития инфекции оказалось формирование пневмонии вирусного генеза и отека легких на 3–6-е сут. после появления первичной симптоматики [7].

Широко применяемые противовирусные препараты группы адамантов (Амантадин и Римантадин) оказались неэффективны против ВГ А / H1N1 "пан" за счет накопления специфических мутаций в вирусном геноме. Согласно рекомендациям ВОЗ, препаратами выбора для лечения ВГ А / H1N1 "пан" являются осельтамивир (Тамифлю) и занамивир (Реленза), устойчивость к которым в популяции еще не сформировалась.

Настоящая работа была проведена с целью оценки генетической изменчивости ВГ А / H1N1 "пан" в условиях эпидемии и обнаружения набора нуклеотидных полиморфизмов человека, предопределяющих тяжелую форму течения заболевания.

В ходе исследования была предложена оригинальная методика забора и транспортировки вирусного материала от пациентов, позволившая достичь высокой эффективности выделения геномной РНК вируса для последующей генетической характеристики. На основании реакций минисеквенирования с последующей детекцией продуктов МАЛДИ-врепролетной масс-спектрометрией созданы системы быстрого обнаружения генетических детерминант устойчивости возбудителя к противовирусным препаратам. Аналогичный принцип использовался для выявления генетической предрасположенности пациентов к развитию тромбозов, бронхолегочных заболеваний и гипертензивных состояний.

### Материалы и методы

Клинический материал от пациентов ( $n = 230$ ) с тяжелыми формами острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) поступал из медицинских центров Москвы, Московской и Свердловской обл. в период с 20 ноября по 20 декабря 2009 г. Одноразовыми синтетическими зондами (*Deltalab*, Испания) брали назофарингеальные мазки, которые сразу же замораживали в 1 мл 4М раствора гуанидина тиоцианата (*Amresco*, США). Венозную кровь забирали в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой, образцы

Таблица 1  
Праймеры и флуоресцентные зонды,  
рекомендованные ВОЗ для выявления вирусов  
гриппа А (H1N1) типов "сезонный" и "пандемический"

| Название        | Последовательность 5'–3'            | Тип вируса        |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------|
| InfA Forward    | gaccratcctgtcacctctgac              | "Сезонный"        |
| InfA Reverse    | agggcattytggacaakcgtcta             |                   |
| InfA Probe      | tcgagtcctcgctcactgggcacg – FAM      |                   |
| SW InfA Forward | gcacgggtcagcacttatctctag            | "Пан-деми-ческий" |
| SW InfA Reverse | gtgrgctgggttttcatttggtc             |                   |
| SW InfA Probe   | cyactgcaagcccatcacacaagcaggca – HEX |                   |

хранили и транспортировали при температуре 4 °С. У пациентов, умерших от осложнений тяжело протекавших ОРВИ, брали аутопсию легочной ткани, которую также сразу же замораживали в 1 мл 4М раствора гуанидина тиоцианата.

Выделение геномной РНК вируса гриппа проводили с использованием микроколонок с сорбирующим фильтром (ООО "Техноклон", Россия) согласно рекомендации производителя. Выделение геномной ДНК из лейкоцитарной фракции венозной крови пациентов выполняли с помощью набора *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, США) согласно инструкции производителя.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) вируса гриппа осуществляли с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы *RevertAid™ Reverse Transcriptase* (200 ед / мкл) (*Fermentas*, Литва) по рекомендуемому производителем протоколу с использованием праймера AGCAAAAGCAGG. Разновидность вируса гриппа определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени. В качестве матрицы использовали кДНК вируса, амплификацию проводили с праймерами и зондами, рекомендованными ВОЗ (табл. 1), на приборе IQ-5 (*BioRad*, США) по предлагаемому протоколу [8].

Амплификацию фрагментов вирусного генома, несущих маркеры устойчивости к противовирусным препаратам, выполняли в мультиплексном формате с использованием праймеров, указанных в табл. 2. Полученные ампликоны анализировали на наличие мутаций, обуславливающих устойчивость к адамантам и осельтамивиру, в реакции минисеквениро-

вания с последующей масс-спектрометрической детекцией по схеме, описанной ранее [9]. Последовательности праймеров и расчетные массы продуктов реакции приведены в табл. 2.

Для полноразмерного геномного секвенирования сегменты вирусного генома амплифицировали в 2 этапа с использованием универсальных праймеров agtcaggcagcaaaagcagg и agaaggagtagaacaagg на 1-м этапе и пар специфических праймеров, рекомендованных ВОЗ [10], – на 2-м. Продукты реакции разделяли горизонтальным электрофорезом в 2 %-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Полосы, соответствующие целевым ампликонам, вырезали из геля и элюировали ДНК центрифугированием при 6 000 об. / мин в течение 5 мин с использованием стекловолоконных фильтров. Определение нуклеотидной последовательности ампликонов осуществляли с помощью набора *Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystem*, США) согласно инструкции производителя, применяя праймеры M13forward и M13reverse. Продукты реакции анализировали на автоматическом секвенаторе *ABI Prism Genetic Analyzer 3730XL* (*Applied Biosystem*, США, *Hitachi*, Япония). Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали против референсной и депонировали в базе данных *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Генотипирование отобранной группы больных в отношении предрасположенности к тяжелому течению респираторного заболевания осуществляли на основании регистрации однонуклеотидных полиморфизмов по схеме, описанной ранее [9]. Праймерные системы приведены в табл. 3.

Результаты

В ходе исследования был сформирован лабораторный банк клинических образцов от больных тяжелыми формами ОРВИ – назальных смывов либо мазков зева (*n* = 225), венозной крови (*n* = 225), аутопсийного материала (*n* = 5). Образцы сопровождалась письмами с указанием лечебного учреждения, номера истории болезни, Ф. И. О. пациента, возраста, пола. Клинический диагноз указывался исходя из данных физикального осмотра и результа-

Таблица 2  
Последовательности олигонуклеотидов для определения устойчивости ВГА / H1N1 "пан" к противовирусным препаратам

| Сегмент | Последовательность праймеров для ПЦР (5'–3')               | Мутация  |               | Последовательность праймеров для минисеквенирования (5'–3'), масса [Да] | Смесь дНТФ / ддНТФ | Масса продуктов реакции минисеквенирования [Да] |             |
|---------|------------------------------------------------------------|----------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------|-------------|
|         |                                                            | АК       | нуклеотид     |                                                                         |                    | норма                                           | мутация     |
| NA      | acgttgatggcctcataagattctcag<br>acgttgatgggataacaggagcattcc | H275Y    | CAC→tAC       | ggagcattcctcatagt, 5185                                                 | dG, ddA            | 5811                                            | 5482        |
| M2      | agctccagtgctggtctgaag<br>gactcaggcactccttcgtagaa           | S31N     | AGT→AaT       | tgcaagatcccaatgata, 5492                                                | ddC,ddT            | 5765                                            | 5780        |
|         |                                                            | L26F     | CTC→Ttc       | cagcgattcaagtgtacct, 5788                                               | ddC,ddT            | 6061                                            | 6076        |
|         |                                                            | A30V / T | GCA→aCA / GtA | tgatcctctcgctcattgca, 5730                                              | ddA,dG,ddT,ddC     | 6332                                            | 6027 / 6347 |
|         |                                                            | G34E     | GGG→GaG       | cacaatatcagggtgcaagatc, 6424                                            | ddT,ddC            | 6712                                            | 6697        |

Примечание: АК – аминокислота, дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, ддНТФ – дедезоксирибонуклеотидтрифосфаты.

Таблица 3

*Последовательность олигонуклеотидов для выявления генетических полиморфизмов, предредающих тяжелое протекание вирусной инфекции*

| Ген   | Последовательность праймеров для ПЦР (5'–3')       | Мутация   |                              | Последовательность праймеров для минисеквенирования (5'–3'), масса [Да] | Смесь дНТФ / ддНТФ | Масса продуктов реакции минисеквенирования [Да] |          |
|-------|----------------------------------------------------|-----------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------|----------|
|       |                                                    | АК        | нуклеотид                    |                                                                         |                    | норма                                           | мутация  |
| ACE   | gccctgcaggtgtctgcagcatgt<br>ggatggctctcccgcttctctc | 16 интрон | IVS16+2123<br>250ннDEL / INS | cctcagcctcccaagtag, 5301                                                | ddC                | 5574-DD                                         | 5678-II  |
| AGT   | ggctgtgacaggatggaagac<br>caggatgtgccgaggctg        | M235T     | T1311C                       | ctgtccacactggctccc, 5372                                                | ddA,dG,ddT         | 5669-TT                                         | 5989-CC  |
| NOS   | ccacagctctgcattcagca<br>atttagagggaaccctggac       | E298D     | T7965G                       | tgaggcccccagatga, 4892                                                  | ddG,dT,ddC         | 5205-GG                                         | 5469 -TT |
| ADRB2 | agtgcgctcacctgccaga<br>aactcgcaccagaagttgccca      | G16R      | G285A                        | ggtcggcgcatggcttc, 5508                                                 | ddA,dC,ddT         | 5781-GG                                         | 6109-AA  |
| MMP1  | tgccactagatgaggaaattgt<br>atggattcctgtttcttctgc    | промотор  | IVS1-1607delG                | gatttgagataagtcatact, 6155                                              | ddC,dT             | 6428-GG                                         | 7350-del |
| SFTPC | ctcccggtcccaacctta<br>gctggcagccaataggagg          | N138T     | A1854C                       | cccagcttgaggctctca, 5740                                                | ddC,ddT,dA         | 6341-AA                                         | 6013-CC  |
| SFTPC | cacagccctcttactgatga<br>tgatgacccccgcttca          | N186S     | A2334G                       | gggcatggccgtga, 4345                                                    | ddC,ddA,dG         | 4642-AA                                         | 4947-GG  |
| F2    | gaagaagtggatcacagaaggtca<br>agctgcccatgaatagcact   | E622K     | G20210A                      | cactgggagcattgaggct, 5869                                               | ddC,ddG,dT         | 6142-GG                                         | 6486-AA  |
| FGB_b | agctattcagcacaaaaaaggg<br>cacaggcaaccactaaaatcg    | промотор  | IVS1-455G>A                  | ttctatttcaaaaggggc, 5514                                                | ddC,dT,ddA         | 5787-GG                                         | 6115-AA  |

Примечание: ACE – ген, кодирующий ангиотензин-конвертирующий фермент; AGT – ген, кодирующий ангиотензиноген; NOS – ген, кодирующий синтазу окиси азота; ADRB2 – ген, кодирующий  $\beta_2$ -адренорецептор; MMP1 – ген, кодирующий матриксную металлопротеиназу-1; SFTPC – ген, кодирующий сурфактантный протеин С; F2 – ген, кодирующий коагуляционный фактор F2; FGB\_b – ген, кодирующий фибриноген.

тов лабораторно-инструментального исследования. У всех умерших больных при тяжелом течении пандемического гриппа А / H1N1 / 2009 была выявлена массивная 2-сторонняя пневмония, синдром острого поражения легких или острый респираторный дистресс-синдромом, быстро прогрессирующая острая дыхательная недостаточность (ОДН), приводящая к значительному снижению уровня насыщения артериальной крови кислородом.

Генетический материал, эстрагированный из 230 назофарингеальных мазков и образцов аутопсии, подвергся тестированию, позволяющему обнаруживать вирус гриппа А / H1N1 с одновременной дифференциацией его по типам "сезонный" и "пандемический". Штамм вируса гриппа А / H1N1 удалось идентифицировать в 77 случаях (34 %). При этом ВГ А / H1N1 "пан" был выявлен в 46 случаях (20 %), а штамм ВГ А / H1N1 "сезонный" – в 31 случае (14 %).

Резистентность ВГ А / H1N1 "пан" к противовирусным препаратам оценивали на основании обнаружения мутации H275Y в сегменте 6 (NA), определяющей его устойчивость к осельтамивиру [11–13], а также мутаций L26F, S31N, A30V, A30T, G34E в сегменте 7 (M2), ассоциированных с устойчивостью к Амантадину и Римантадину [14–16]. Мутация S31N в сегменте 7 (M2) (рис. 1) была обнаружена во всех 46 образцах, в остальных исследованных кодонах сегмента 7 (M2) мутаций не найдено. Устойчивый к осельтамивиру штамм с мутацией H275Y сегмента 6 (NA) выявлен у 1 пациента (рис. 2).

На основании накопленных знаний о механизмах взаимодействия ВГ А / H1N1 "пан" и человеческо-

го организма был проведен совокупный анализ полиморфизмов в генах человека, относящихся к системам регуляции свертывания крови, сурфактантного

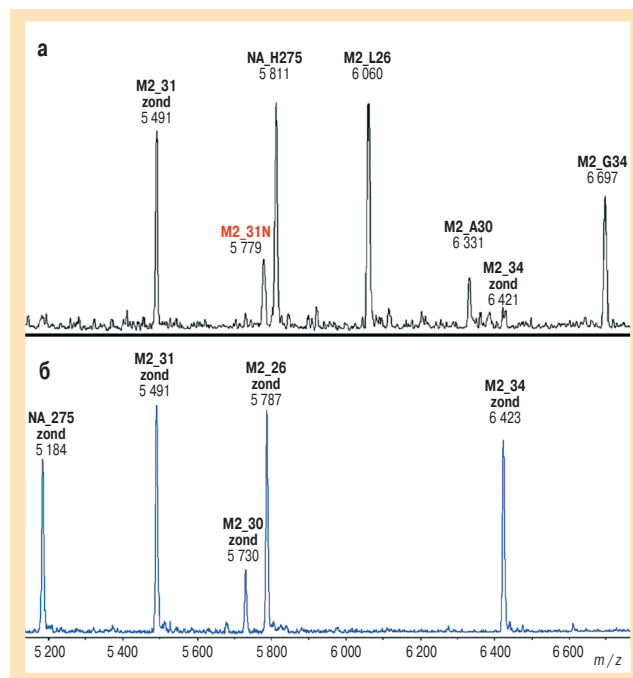


Рис. 1. Пример масс-спектра мультиплексной реакции минисеквенирования: а – пики соответствуют массам продуктов минисеквенирования для кодонов 26, 31, 30, 34 сегмента 7 (M2) и кодона 275 сегмента 6 (NA); выявлены следующие генотипы: L26, SN31 (мутантный), A30, G34 в сегменте 7 (M2) и H275 в сегменте 6 (NA); б – на приведенном масс-спектре отрицательного контроля все пики соответствуют массам зондов, внесенных в реакцию

Примечание: m / z – отношение масса / заряд.

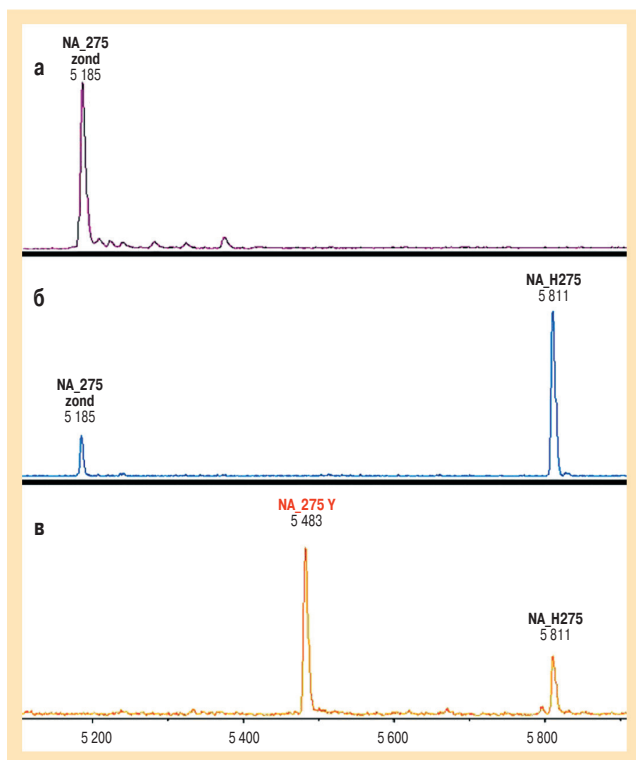


Рис. 2. Пример масс-спектров типирования мутации H275Y в сегменте 6 (NA) в одноплексном формате: а — отрицательный контроль; б — образец, содержащий штамм без мутации; в — образец со смесью мутантного и дикого штаммов

звена и сосудистого тонуса (табл. 3), продукты которых играют ведущую роль в патогенезе дистресс-синдрома и могут определять тяжелое протекание ОРВИ. После изучения 46 образцов, полученных от пациентов с идентифицированным штаммом ВГ А / H1N1 "пан", были отобраны 25 пациентов со среднетяжелыми и тяжелыми формами гриппа, 14 из которых находились на лечении в ИКБ № 1 Москвы. Среди наблюдаемых больных было 11 женщин, 2 мужчины в возрасте от 19 до 55 лет (средний возраст составил  $30,1 \pm 2,2$  года) и 1 новорожденный мальчик, умерший на 2-е сут. после рождения. Среди женщин было 8 беременных, находящихся на разных сроках беременности (1-й триместр — 1 пациентка, 2-й триместр — 4 женщины, 3-й триместр — 3). У всех пациентов диагноз гриппа был подтвержден обнаружением РНК вируса гриппа А (H1N1) в носоглоточном смыве методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. У 9 больных заболевание имело среднетяжелое течение, у 6 из них сопровождалось развитием диффузного бронхита, у 2 — очагово-сливной пневмонии, без развития выраженной ОДН, у 2 пациенток был выявлен острый катаральный отит и острый гнойный 2-сторонний верхнечелюстной синусит. Все случаи среднетяжелого течения гриппа закончились выздоровлением. Тяжелое течение гриппа было диагностировано у 5 пациентов (3 женщины, 1 мужчина, 1 ребенок), у всех наступил летальный исход. У 3 из 5 больных с тяжелым течением гриппа (60 %) наблюдалось выраженное нарушение жирового обмена (ожирение 3-й степени),

у 2 — коронарокардиосклероз, ишемическая болезнь сердца, у 1 пациентки была гипертоническая болезнь, у 1 — хроническая аневризма верхушки левого желудочка, слипчивый перикардит, состояние после аортокоронарного шунтирования, у 3 — хронический пиелонефрит, у 1 — хронический гепатит В, у 1 — сахарный диабет, у 1 — пневмосклероз, эмфизема легких. Заболевание гриппом у этих больных сопровождалось развитием массивной 2-сторонней пневмонии и интерстициального и альвеолярного отека легких, быстро прогрессирующей ОДН, что требовало респираторной поддержки (всем больным этой группы проводилась искусственная вентиляция легких). У 4 из 5 пациентов с тяжелым течением гриппа наблюдался выраженный геморрагический синдром. Среди умерших были 1 беременная женщина (смерть наступила после оперативного родоразрешения при антенатально погибшем плоде на 27-й нед. беременности), а также новорожденный мальчик, родившийся глубоко недоношенным при сроке беременности 28 нед. путем операции "кесарево сечение" от матери, болевшей пандемическим гриппом А / H1N1 / 2009. Ребенок при рождении имел массу — 1 500 г, длину тела — 38 см, оценку по шкале Апгара — 2–4 балла. У него было выявлено внутриутробное инфицирование вирусом пандемического гриппа А / H1N1 / 2009, сопровождавшееся развитием бронхопневмонии.

При исследовании пациентов на предрасположенность к нарушениям в системе регуляции сосудистого тонуса, обусловленных мутациями в генах NOS, ADRB2, AGT и ACE [17–19], в образцах ДНК 14 из 25 пациентов были обнаружены как минимум 3 полиморфизма, и лишь в единственном случае был отмечен полиморфизм только в 1 гене. Для пациентов с летальными исходами в 3 случаях из 5 также было показано наличие сочетанных полиморфизмов генов, приводящих к нарушениям в системе регуляции сосудистого тонуса. Аналогично у 13 из 25 пациентов были обнаружены полиморфизмы генов, кодирующих антикоагуляционный фактор F2 и фибриноген, предрасполагающие к развитию тромбофилии [20–22]. При этом в 3 из 5 случаев летального исхода также были обнаружены указанные полиморфизмы. Кроме того, у всех 25 пациентов присутствовали полиморфизмы генов, кодирующих сурфактантный протеин С и матриксную металлопротеиназу-1, ассоциированные с развитием бронхолегочной патологии [23, 24]. При этом у 19 из 25 пациентов были одновременно выявлены мутантные аллели по всем 3 локусам.

Примечательно, что в ходе генетического тестирования удалось выявить группу из 12 пациентов, включающую 3 больных с летальным исходом, у которых были обнаружены полиморфизмы одновременно в 8 из 9 протестированных генов. Также при исследовании было показано отсутствие пациентов с выявленным мутантным аллелем только в 1 из 3 анализируемых профилей (табл. 4).

Для 10 образцов ВГ А / H1N1 "пан", полученных от пациентов из Москвы и Московской обл. с тяже-

Таблица 4

Распределение пациентов, согласно обнаружению мутантных аллелей в группах генов, ответственных за формирование бронхолегочной патологии (MMP1, STEPC), тромбофилии (F2, FGB) и вазоконстрикции (NOS, ADRB2, AGT, ACE)

|                                                                            | Бронхолегочная патология + гипертензия | Бронхолегочная патология + тромбофилия | Гипертензия + тромбофилия |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------|
| Количество пациентов с выявленными мутантными аллелями только в 2 профилях | 12 / 25 (48 %)<br>2 / 5 (40 %)*        | 0                                      | 0                         |
| Количество пациентов с выявленными мутантными аллелями в 3 профилях        |                                        | 13 / 25 (52 %)<br>3 / 5 (60 %)*        |                           |

Примечание: \* – пациенты с летальным исходом.

Таблица 5

Перечень геномных последовательностей ВГА / H1N1 "пан", депонированных в GenBank

| Изолят                         | Место выделения   | Номера последовательностей (сегменты 1-8) |
|--------------------------------|-------------------|-------------------------------------------|
| A / Russia / 149 / 2009 (H1N1) | Москва            | CY053413-CY053420                         |
| A / Russia / 165 / 2009 (H1N1) | Свердловская обл. | CY053624-CY053631                         |
| A / Russia / 14 / 2009 (H1N1)  | Москва            | CY053678-CY053685                         |
| A / Russia / 191 / 2009 (H1N1) | Москва            | CY053686-CY053693                         |
| A / Russia / 74 / 2009 (H1N1)  | Москва            | CY053725-CY053732                         |
| A / Russia / 178 / 2009 (H1N1) | Свердловская обл. | CY053733-CY053740                         |
| A / Russia / 190 / 2009 (H1N1) | Свердловская обл. | CY053741-CY053748                         |
| A / Russia / 200 / 2009 (H1N1) | Москва            | CY053749-CY053756                         |
| A / Russia / 4 / 2009 (H1N1)   | Москва            | CY054627-CY054634                         |
| A / Russia / 12 / 2009 (H1N1)  | Москва            | CY054635-CY054642                         |
| A / Russia / 19 / 2009 (H1N1)  | Москва            | CY054643-CY054650                         |
| A / Russia / 61 / 2009 (H1N1)  | Москва            | CY054651-CY054658                         |
| A / Russia / 100 / 2009 (H1N1) | Москва            | CY054659-CY054666                         |
| A / Russia / 171 / 2009 (H1N1) | Свердловская обл. | CY054667-CY054674                         |
| A / Russia / 180 / 2009 (H1N1) | Свердловская обл. | CY054675-CY054682                         |

лым течением заболевания либо из аутопсийного материала, а также для 5 образцов от пациентов из Свердловской обл., были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности 8 сегментов вирусного генома, в последующем депонированные в GenBank (табл. 5).

Обсуждение

Выявление ВГА / H1N1 "пан" лишь в 46 случаях из 230, проанализированных в данной работе, подтверждает, что дифференциальный диагноз пандемический грипп может быть поставлен только на основании генотипирования возбудителя. Причем процедура тестирования должна осуществляться на ранних стадиях болезни, поскольку для данной формы вирусной инфекции характерны бурное течение и высокий риск развития осложнений, в т. ч. приводящее к летальному исходу, в первые несколько дней после появления симптоматики.

Разработанная система быстрого обнаружения генетических детерминант резистентности ВГА / H1N1 "пан" к противовирусным препаратам подтвердила абсолютную устойчивость данного возбудителя к препаратам группы адамантов. Полученные с использованием описанного подхода данные были

полностью подтверждены для 10 образцов, для которых были определены полноразмерные последовательности сегментов вирусного генома. Выявление

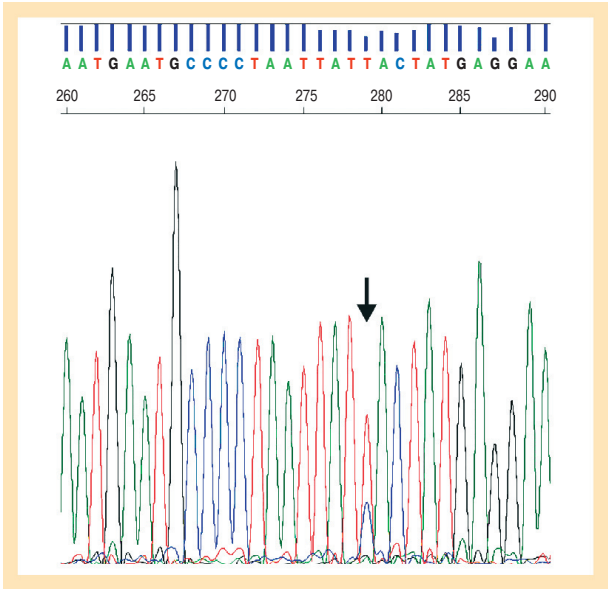


Рис. 3. Фрагмент электрофореграммы последовательности сегмента 6 (NA) вируса A / Russia / 61 / 2009 (H1N1)  
Примечание: стрелкой указаны пики, соответствующие нуклеотидам С и Т в положении 823.

мутации H275Y гена нейраминидазы (NA) лишь в 1 образце из 46 свидетельствует о достаточно малом риске присутствия резистентности к осельтамивиру в российской популяции вируса. При этом анализ показал наличие у данного пациента вируса одновременно 2 генотипов, что выражается в наличии характерных пиков на масс-спектре (рис. 2в) и подтверждается присутствием в положении 823 п. н. сегмента 6 (NA) вируса А / Russia / 61 / 2009 (H1N1) (CY054656) 2 пиков, соответствующих нуклеотидам Т и С, на электрофореграмме (рис. 3). Одновременное присутствие нормального и мутантного генотипов может свидетельствовать о повторном заражении пациента, о возникновении мутации вируса *de novo* или об исходном инфицировании 2 штаммами вируса.

Исход любого инфекционного заболевания зависит от совокупности факторов, определяемых как индивидуальными свойствами инфекционного агента (вирулентность, контагиозность, устойчивость к антибактериальным агентам, иммуногенность), так и индивидуальными особенностями пациента, среди которых генетическая предрасположенность может быть легко определена и интерпретирована благодаря развитию технологий анализа нуклеиновых кислот.

С учетом высокого риска развития дистресс-синдрома больным с идентифицированным ВГ А / H1N1 "пан" было проведено генотипирование на предрасположенность к тяжелому течению респираторного заболевания. Безусловно, для получения достоверных выводов необходимо проведение широкомасштабных эпидемиологических исследований. Однако закономерности, обнаруженные даже на ограниченной выборке пациентов с тяжелыми формами гриппа (5 случаев с летальным исходом), дают основание полагать, что генотипы, ассоциированные с нарушениями процессов синтеза сурфактанта, регуляции вазоконстрикции и тромбообразования, свидетельствуют о предрасположенности к развитию тяжелых форм течения заболевания.

Развитие гриппа, как и многих других острых респираторных инфекций, создает характерную патогенетическую ситуацию, когда на основные системы пациента добавляется нагрузка, выявляющая скрытые генетические дефекты, компенсированные в условиях обычной жизнедеятельности. В ходе данного исследования не удалось учесть все факторы, способные влиять на тяжесть гриппозной инфекции. Остается открытым вопрос о вкладе в развитие инфекции сапрофитной микрофлоры дыхательного тракта, хотя существует мнение, что именно в случае ВГ А / H1N1 "пан" этот вклад незначителен [25]. Кроме того, окончательно не выявлено влияние времени 1-го приема ингибиторов нейраминидазы и других вспомогательных терапевтических средств на тяжесть течения заболевания. Однако уже сейчас можно констатировать, что проведение своевременной диагностики и типирования вируса с одновременной оценкой генетического статуса пациента может существенно увеличить эффективность лечения тяжелых форм гриппа.

## Литература

1. "Transcript of virtual press conference with Dr Keiji Fukuda, Assistant Director-General ad Interim for Health Security and Environment, World Health Organization". World Health Organization. 2009-07-07. [http://www.who.int/mediacentre/Pandemic\\_h1n1\\_presstranscript\\_2009\\_07\\_07.pdf](http://www.who.int/mediacentre/Pandemic_h1n1_presstranscript_2009_07_07.pdf).
2. "Interim Novel Influenza A (H1N1) Guidance for Cruise Ships". Centers for Disease Control and Prevention. 2009-08-05. <http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/cruiseships.html>.
3. Chan M. World now at the start of 2009 influenza pandemic. World Health Organization. 2009-06-11. [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html).
4. "CDC Briefing on Investigation of Human Cases of H1N1 Flu". Centers for Disease Control and Prevention. 2009-07-24. <http://www.webcitation.org/5jeG7e0IC>
5. Interim Guidance for 2009 H1N1 Flu (Swine Flu): Taking Care of a Sick Person in Your Home. Centers for Disease Control and Prevention. 2009-08-05. <http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/homecare.html>.
6. Mauad T., Hajjar L.A., Callegari G.D. et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2010; 181 (1): 72–79.
7. Clinical features of severe cases of pandemic influenza. World Health Organization. 2009-10-16 [http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1\\_clinical\\_features\\_20091016/en](http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_clinical_features_20091016/en)
8. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). World Health Organization. [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR\\_SwineH1Assay-2009\\_20090430.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf).
9. Ilina E.N., Malakhova M.V., Generozov E.V. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (mass spectrometry) for hepatitis C virus genotyping. J. Clin. Microbiol. 2005; 43 (6): 2810–2815.
10. Sequencing primers and protocol. World Health Organization. [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/GenomePrimers\\_20090512.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/GenomePrimers_20090512.pdf).
11. Le Q.M., Wertheim H.F., Tran N.D. et al. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. N. Engl. J. Med. 2010; 362 (1): 86–87.
12. Gulland A. First cases of spread of oseltamivir resistant swine flu between patients are reported in Wales. Br. Med. J. 2009; 339: b4975.
13. Eshaghi A., Bolotin S., Burton L. et al. Genetic microheterogeneity of emerging H275Y influenza virus A (H1N1) in Toronto, Ontario, Canada from the 2007–2008 respiratory seasons. J. Clin. Virol. 2009; 45: 142–145.
14. Holsinger L.J., Nichani D., Pinto L.H. et al. Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. J. Virol. 1994; 68 (3): 1551–1563.
15. Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell 1992; 69 (3): 517–528.
16. Pinto L.H., Lamb R.A. Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. Mol. Biosyst. 2007; 3 (1): 18–23.
17. Wang W.Y.S., Glenn C.L., Zhang W. et al. Exclusion of angiotensinogen gene in molecular basis of human hypertension: sibpair linkage and association analyses in Australian Anglo-Caucasians. Am. J. Med. Genet. 1999; 87: 53–60.
18. Kobashi G., Yamada H., Ohta K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. Am. J. Med. Genet. 2001; 103: 241–244.

19. *Contopoulos-Ioannidis D.G., Manoli E.N., Ioannidis J.P.A.* Meta-analysis of the association of beta-2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 963–972.
20. *Lahti M., Marttila R., Hallman M.* Surfactant protein C gene variation in the Finnish population-association with perinatal respiratory disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 2004; 12: 312–320.
21. *Nogee L.M., Dunbar A.E., Wert S. et al.* Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 573–579.
22. *Joos L., He J.-Q., Shepherdson M.B. et al.* The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 569–576.
23. *Franco R.F., Trip M.D., ten Cate H. et al.* The 20210G-A mutation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br. J. Haematol.* 1999; 104: 50–54.
24. *Tybjærg-Hansen A., Agerholm-Larsen B., Humphries S.E. et al.* A common mutation (G(-455)-to-A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease: a study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 3034–3039.
25. *Gómez-Gómez A., Magaña-Aquino M., García-Sepúlveda C.A.* Severe pneumonia associated with Pandemic (H1N1) 2009 outbreak, San Luis Potosí, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16: 27–34.

## Информация об авторах

*Кострюкова Елена Сергеевна* – к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований в биологии ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-44-38; e-mail: el-es@yandex.ru

*Захаржевская Наталья Борисовна* – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел. (499) 246-04-71; e-mail: natazaha@gmail.com

*Костин Петр Андреевич* – научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-04-71; kostin.ru@gmail.com

*Ильина Елена Николаевна* – д. б. н., зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-04-71; e-mail: ilinaen@gmail.com

*Ларин Андрей Константинович* – младший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований в биологии ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-44-38; e-mail: zelaz@yandex.ru

*Грибанов Олег Георгиевич* – к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований в биологии ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-44-38; e-mail: gribanov@hotmail.com

*Селезнева Оксана Викторовна* – лаборант-исследователь лаборатории постгеномных исследований в биологии ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-44-38; e-mail: oks-selezneva@yandex.ru

*Приходько Елена Александровна* – младший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований в биологии ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-44-38; e-mail: less\_lena@rambler.ru

*Акопиан Татьяна Абрамовна* – к. х. н., старший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований в биологии ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-44-38; e-mail: ta-akopian@yandex.ru

*Генерозов Эдуард Викторович* – к. б. н., зав. лабораторией молекулярной генетики человека ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 246-04-71; e-mail: generozov@gmail.com

*Лазарев Василий Николаевич* – к. б. н., зав. лабораторией геномной инженерии ФГУ "НИИ ФХМ" ФМБА России; тел.: (499) 245-42-36; e-mail: lazarev0@gmail.com

Поступила 07.09.11

© Коллектив авторов, 2011

УДК [616.98:578.831]-036.22