

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Львов Д.К.¹, Богданова В.С.¹, Кириллов И.М.¹, Щелканов М.Ю.², Бурцева Е.И.¹, Бовин Н.В.³, Федякина И.Т.¹, Прилипов А.Г.¹, Альховский С.В.¹, Самохвалов Е.И.¹, Прошина Е.С.¹, Кириллова Е.С.¹, Сыроешкин А.В.⁴

ЭВОЛЮЦИЯ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)pdm09 В 2009-2016 гг.: ДИНАМИКА РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПЕРВОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА (HA1)

¹ 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, Россия;

² Дальневосточный федеральный университет (ДФУ), 690950, Приморский край, г. Владивосток, Россия;

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, г. Москва, Россия;

⁴ Российский Университет Дружбы Народов, 117198, г. Москва, Россия

Введение. Возникший в 2009 г. реассортант вируса гриппа свиней А(H1N1)pdm09 преодолел видовой барьер и стал причиной пандемии 2009–2010 гг. Одним из ключевых моментов, необходимых для преодоления вирусом гриппа видовой барьера и адаптации его к человеку, является специфичность его связывания с рецепторами эпителия дыхательных путей человека. **Цели и задачи.** Изучение динамики рецепторной специфичности (РС) первой субъединицы гемагглютинаина (HA1) штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированных в 2009–2016 гг. на территории РФ, и анализ возможного влияния этих изменений на показатели заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны. **Материал и методы.** Использованы стандартные методы сбора клинических материалов, изоляции вирусов гриппа, их типирования и секвенирования генома. Для изучения РС вируса гриппа А(H1N1)pdm09 применяли метод твердофазного сиалозидферментного анализа. **Результаты.** Показано, что изменение параметра $W_{3/6}$, характеризующего степень превышения α 2-3 рецепторной специфичности (α 2-3-РС) вируса гриппа А(H1N1)pdm09 над α 2-6-РС, совпадает с изменением показателя заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны. Наблюдается тенденция к повышению сродства вируса А(H1N1)pdm09 к α 2-3-сиалогликополимерам (СГП) - аналогам сиалил-гликановых рецепторов эпителия респираторного тракта человека, и снижению к α 2-6-СГП, причём наибольшее сродство вирус проявляет к сульфатированным сиалогликополимерам. **Обсуждение.** Скрининг РС штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированных на территории РФ в 2009–2016 гг., выявил снижение сродства вирусов к α 2-6-сиалозидам, особенно к 6'SL-СГП, что, вероятно, связано с наличием аминокислотных замен в 222-й и 223-й позициях РСС HA1 вирусов. Проведённые ранее исследования показали, что наличие таких замен коррелирует с возрастом вирулентности вируса гриппа А(H1N1)pdm09 [16, 23]. Вероятно, произошла эволюция пандемического вируса в направлении селекции более вирулентных пневмотропных вариантов. **Заключение.** Мониторинг РС пандемического вируса гриппа позволяет выявлять штаммы с изменённой РС к эпителию респираторного тракта человека и повышенной способностью к передаче от человека к человеку. Изменение в 2009–2016 гг. параметра $W_{3/6}$, характеризующего степень превышения α 2-3-РС вируса гриппа А(H1N1)pdm09 над α 2-6-РС, совпадает с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны.

Ключевые слова: грипп; вирус гриппа А(H1N1)pdm09; эпидемический сезон; гемагглютинин; рецепторная специфичность; сиалил-гликановый рецептор; сиалогликополимер.

Для цитирования: Львов Д.К., Богданова В.С., Кириллов И.М., Щелканов М.Ю., Бурцева Е.И., Бовин Н.В., Федякина И.Т., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Прошина Е.С., Кириллова Е.С., Сыроешкин А.В. Эволюция пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в 2009-2016 гг.: динамика рецепторной специфичности первой субъединицы гемагглютинаина (HA1). *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(2): 63-72.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-63-72>

Lvov D.K.¹, Bogdanova V.S.¹, Kirillov I.M.¹, Shchelkanov M.Yu.², Burtseva E.I.¹, Bovin N.V.³, Fedyakina I.T.¹, Prilipov A.G.¹, Alhovskiy S.V.¹, Samokhvalov E.I.¹, Proshina E.S.¹, Kirillova E.S.¹, Syroeshkin A.V.⁴

EVOLUTION OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUS A(H1N1)pdm09 IN 2009-2016: DYNAMICS OF RECEPTOR SPECIFICITY OF THE FIRST HEMAGGLUTININ SUBUNIT (HA1)

¹ Ivanovsky Institute of Virology «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician NF Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690950, Primorsky Krai, Russian Federation;

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997, Russian Federation;

⁴ Peoples Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, 117198, Russian Federation

Для корреспонденции: Львов Дмитрий Константинович, академик РАН, профессор, д-р мед. наук, 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: dk_lvov@mail.ru

Introduction. The new reassortant of the swine flu virus A(H1N1)pdm09, which emerged in 2009, overcame the species barrier and caused the 2009-2010 pandemic. One of the key points required for the influenza virus to overcome the species barrier and adapt it to humans is its specific binding to the receptors on the epithelium of the human respiratory tract. **Targets and goals.** Studying the dynamics of changes in receptor specificity (RS) of the HA1 subunit of the hemagglutinin of the influenza A(H1N1)pdm09 virus strains isolated during the period 2009-2016 on the territory of the Russian Federation, and an analysis of the possible impact of these changes on the incidence rates of the population of the Russian Federation of pandemic influenza in certain epidemic seasons. **Material and Methods.** Standard methods of collecting clinical materials, isolation of influenza viruses, their typing and genome sequencing were used. For the study of RS of influenza A virus (H1N1)pdm09, the method of solid phase sialosidase analysis was used. **Results.** It is shown that the change in the parameter $W_{3/6}$, which characterizes the degree of $\alpha 2$ -3 receptor specificity ($\alpha 2$ -3-RS) of the influenza virus A(H1N1)pdm09 over $\alpha 2$ -6-RS, coincides with the change in the incidence rates of the Russian Federation's pandemic flu in separate epidemic seasons. There is a tendency to increase the affinity of the virus A(H1N1)pdm09 to $\alpha 2$ -3 analogs of the sialyl-glycan receptors of the human respiratory tract epithelium - $\alpha 2$ -3-sialoglycopolymers ($\alpha 2$ -3-SGP), and falls to $\alpha 2$ -6-SGP, with the virus showing the greatest affinity for sulfated sialoglycopolymers. **Discussion.** Screening for RS strains of influenza A (H1N1)pdm09 virus isolated on the territory of the Russian Federation in 2009–2016 revealed a decrease in the affinity of viruses for $\alpha 2$ -6-sialosides, especially for 6'SL-SGP, which is probably due to the presence of amino acid substitutions in the 222 and 223 positions of RBS HA1 viruses. Previous studies have shown that the presence of such substitutions correlates with an increase in the virulence of the influenza A virus (H1N1)pdm09 [16, 23]. Probably, the pandemic virus has evolved towards the selection of more virulent pneumotropic variants. **Conclusion.** Monitoring of the receptor specificity of a pandemic influenza virus makes it possible to identify strains with altered RS to the epithelium of the human respiratory tract and an increased ability to transfer from person to person. Change in the period 2009-2016 the $W_{3/6}$ parameter characterizing the degree of $\alpha 2$ -3-RS excess of the influenza A(H1N1)pdm09 virus over $\alpha 2$ -6-RS, coincides with the change in the incidence rates of the pandemic influenza population of the Russian Federation in certain epidemic seasons.

Keywords: influenza; influenza virus A(H1N1)pdm09; epidemic season; hemagglutinin (HA); receptor specificity; sialyl-glycan receptor; sialoglycopolymer (SGP).

For citation: Lvov D.K., Bogdanova V.S., Kirillov I.M., Shchelkanov M.Yu., Burtseva E.I., Bovin N.V., Fedyakina I.T., Prilipov A.G., Alhovsky S.V., Samokhvalov E.I., Proshina E.S., Kirillova E.S., Syroeshkin A.V. Evolution of pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09 in 2009-2016: dynamics of receptor specificity of the first hemagglutinin subunit (HA1). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2):63-72. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-63-72>

For correspondence: Dmitry K. Lvov, MD, PhD, DSc, prof., academician of RAS; Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: dk_lvov@mail.ru

Information about authors:

Lvov D.K., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Bogdanova V.S., <https://orcid.org/0000-0003-4353-9826>

Proshina E.S., <https://orcid.org/0000-0003-2348-811X>

Samokhvalov E.I., <https://orcid.org/0000-0001-7444-805X>

Shchelkanov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Acknowledgment. The publication was prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100». [Peoples Friendship University of Russia (RUDN), Moscow, 117198, Russian Federation]

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

Received 09 October 2018

Accepted 31 October 2018

Возникший в 2009 г. реассортант вируса гриппа свиней A(H1N1)pdm09, вытеснивший из активной циркуляции в популяции человека эпидемический вирус гриппа A(H1N1), стал причиной пандемии 2009–2010 гг. и доминирующим агентом в этиологии большинства последующих эпидемических сезонов [1–4]. В связи с этим контроль за распространением пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09, обладающего повышенной вирулентностью, является важнейшей задачей по обеспечению биобезопасности.

Вирусы гриппа заметно различаются по эффективности передачи от человека к человеку. Эти различия определяются, в частности, тропизмом вируса к эпителию верхних дыхательных путей человека. Одним из ключевых факторов, влияющих на тропизм вируса гриппа к эпителиальным клеткам хозяина, является процесс узнавания расположенных на поверхности клеток рецепторов. Адаптация вирусов гриппа к хозяину осуществляется главным образом с помощью гемагглютинина, запускающего процессы присоеди-

нения к клетке хозяина и репликации вируса с его дальнейшей трансмиссией. Таким образом, степень аффинности гемагглютинина к клеточным рецепторам тканей хозяина, т.е. рецепторная специфичность (РС) вируса, играет ключевую роль в ограничении межвидового переноса.

Для распознавания вирусом гриппа рецепторов на клеточной поверхности и связывания с ними служит рецепторный карман, который образован 130-й (135–138) и 220-й (221–228) аминокислотными петлями и спиралью 190 (190–198 а.к.) (нумерация по подтипу H3 гемагглютинина) и расположен в глобулярной части гемагглютинина [5].

РС вируса определяется природой формирующихся карман аминокислот; они консервативны у разных подтипов вируса гриппа и влияют на аффинитет вируса к клеточным рецепторам эпителия респираторного тракта человека [6, 7]. Минимальной детерминантой последних является сиаловая кислота, или N-ацетилнейраминаовая кислота (5-амино-3,5-дидезокси-D-глицеро-D-галакто-2-нонулозоновая

кислота, Neu5Ac), соединённая с углеводным кором α 2-3- или α 2-6-гликозидной связью [8].

Известно, что степень сродства вирусов гриппа разных видов животных к клеточным рецепторам зависит, в частности, от вида связи остатка сиаловой кислоты с субтерминальным остатком галактозы (т.е. Neu5Ac α 2-3Gal- или Neu5Ac α 2-6Gal-связь) [9, 10]. Для вирусов гриппа человека и классических вирусов гриппа свиней характерно взаимодействие с сиаловыми кислотами, связанными с галактозой α 2-6-связью, тогда как для вирусов гриппа птиц и лошадей – α 2-3-связью [11, 12].

Адаптация вируса гриппа к разным хозяевам происходит, в частности, благодаря точечным мутациям в гемагглютинине, способным изменить спектр РС вируса и, соответственно, его тропизм к тканям. Первые данные о находках таких мутантов за рубежом и в России приведены в работах [13–21]. Оценка РС гемагглютинина циркулирующих вирусов гриппа может улучшить прогноз появления штамма с повышенной вирулентностью и способствовать разработке мероприятий по предупреждению пандемии.

В рамках осуществления эпидемиологического надзора за циркуляцией вирусов гриппа в Российской Федерации с начала пандемии свиного гриппа с 2009 г. в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России проводится скрининг РС штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, изолированных на территории РФ, с целью анализа её динамики и выявления возможной связи этого процесса с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом, а также с наличием аминокислотных замен в первой субъединице гемагглютинина вируса. В работе представлены результаты изучения РС HA1 вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг.

Материал и методы

Сбор клинических материалов для исследований. В Центр экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России из региональных вирусологических лабораторий в 10 городах РФ, а также из лечебных учреждений (больниц, поликлиник) поступали носоглоточные смывы и секционный материал (ткани бронхов, трахеи, лёгких, селезёнки, плаценты) для выявления или подтверждения инфекции, вызванной пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09.

Изоляцию вирусов гриппа проводили из клинического материала (носоглоточные смывы и секционный материал) на клетках культуры ткани MDCK и развивающихся куриных эмбрионах по общепринятым методикам. Для индикации вируса в реакции гемагглютинации использовали 0,75% взвесь эритроцитов человека 0 (I) группы крови.

Типирование изолятов осуществляли в реакции торможения гемагглютинирующей активности по об-

щепринятой методике с диагностической сывороткой против эталонного вируса гриппа A/California/7/2009 A(H1N1)pdm09.

РНК вируса гриппа A(H1N1)pdm09 выявляли с помощью тест-систем Ампли-Сенс «Influenza viruses A/B», Ампли-Сенс «Influenza viruses A/H1-swine-FL», Ампли-Сенс «Influenza viruses A-тип-FL» (Интерлабсервис, Москва) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование генома. РНК выделяли стандартным методом с применением набора «Viral RNA Kit» согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили на приборе «Bio-Rad C1000 Touch» с использованием специфических праймеров. Первичную нуклеотидную последовательность фрагментов ОТ-ПЦР определяли методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя. Нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные последовательности анализировали, используя пакет прикладных программ «Lasergene» (DNASTAR Inc., США).

Для типирования РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (точнее – HA1 вируса) использован метод твердофазного сиалозидферментного анализа, основанный на определении взаимодействия рецептор-связывающего сайта (PCC) HA1 вируса с аналогами клеточных рецепторов – 9 синтетическими сиалогликополимерами (СПП), углеводная часть которых, связанная с биотинилированным акриламидным полимером (молекулярная масса 30 кДа), содержит как неразветвлённые, так и разветвлённые сиалогликаны (Lectinity Holding Inc., Москва, Россия) (табл. 1) [18]. Анализировали вируссодержащую культуральную или аллантоисную жидкость с титром вируса гриппа A(H1N1)pdm09 16 АЕ/мл.

Для оценки РС использован параметр $W_{3/6}$, который характеризует превышение α 2-3 рецепторной специфичности (α 2-3-РС) над α 2-6-РС и рассчитывается по формуле:

$$W_{3/6} = [d(3'SL) + d(3'SLN)]/[d(6'SL) + d(6'SLN)],$$

где d – сигнал оптической плотности в СФА, соответствующий данному СПП, за вычетом фонового значения [18].

При определении $W_{3/6}$ использованы 4 наиболее информативные неразветвлённые СПП. Реактивность к ним отражает базовые особенности специфичности вируса по отношению к сиалогликану: при $W_{3/6} < 1$ преобладает α 2-6 РС, при $W_{3/6} > 1$ доминирует α 2-3 РС [18].

Наряду с оценкой РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 по параметру $W_{3/6}$ сродство вируса к каждому из 9 СПП выражали в процентах (P) от суммарного сигнала оптической плотности, соответствующего всем 9 СПП:

$$P = (d_i/\sum d_i) \cdot 100,$$

где P – вклад каждого СПП в рецепторную специфичность вируса, d_i – сигнал оптической плотности для соответствующего СПП, $\sum d_i$ – суммарный сигнал оптической плотности, соответствующий 9 СПП.

Результаты

Анализ вирусов гриппа A(H1N1), изолированных в первую волну пандемии в сезон 2009–2010 гг. от

Таблица 1

Аналоги клеточных рецепторов – синтетические сиалогликополимеры, полимер – биотинилированный полиакриламид

Обозначение	Углеводная часть
3'SL	Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ
3'SLN	Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ
Su-3'SLN	Neu5Acα2-3Galβ1-4-(6-Su)GlcNAcβ
SLe ^a	Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ
SLe ^c	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ
SLe ^x	Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ
6'SL	Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ
6'SLN	Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ
Su-6'SLN	Neu5Acα2-6Galβ1-4-(6-Su)GlcNAcβ

пациентов с благополучным исходом заболевания (консенсусные штаммы), показал, что они не содержали аминокислотных замен в РСС HA1 и обладали РС, характерной для эпидемических вирусов гриппа А(H1N1) человека (табл. 2).

До октября 2009 г., в основном, приходилось исследовать случаи с благоприятным исходом заболевания, за исключением 1 из 80 проб от пациента с тяжёлой пневмонией, в секционном материале которого была выявлена примерно эквимольная смесь консенсусного (немутантного), содержащего в 222-й позиции аспарагиновую кислоту (D222), и мутантного – с глицином в 222-й позиции (G222) штамма вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в пределах РСС гемагглютинаина. Этот вирус – А/IV-Элиста/64/2009 (H1N1)sw1, как и прототипный умеренно вирулентный эталонный штамм ВОЗ А/California/07/2009 ($W_{3/6} = 1,139$; табл. 3), обладал смешанной РС ($W_{3/6} = 1,190$) [17].

Повышенное сродство эталонного вируса гриппа А/California/07/2009 к α2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,139$; см. табл. 3) указало на возможность эволюции пан-

демического вируса в направлении селекции более вирулентных пневмотропных вариантов. Так, О.В. Масалова и соавт. [22] обнаружили в эталонном штамме ВОЗ А/California/07/2009 4 аминокислотные замены: Q240R (по номенклатуре зрелого HA1 – Q223R), V338I, T220S и S100P. Повышенное сродство вируса А/California/07/2009 к α2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,139$; см. табл. 3), вероятно, связано именно с наличием мутации Q223R, так как наши исследования показали, что возрастание вирулентности вируса гриппа А(H1N1)pdm09 коррелирует с наличием аминокислотных замен в 222-й и 223-й позициях РСС HA1 [16, 23]. Вирусы с такой мутацией чаще выделяют от больных с тяжелой формой гриппа, а также из секционного материала нижних дыхательных путей пациентов с летальным исходом заболевания (как правило, погибших от летальной первичной вирусной пневмонии) [18–21].

С ноября 2009 г. стали регулярно поступать секционные материалы от пациентов с летальной пневмонией. В 70% летальных случаев в лёгочной ткани умерших в ноябре-декабре 2009 г. пациентов были выявлены мутанты пандемического гриппа А(H1N1)pdm09 с заменами в РСС гемагглютинаина: D222G (15%), D222N (15%), D222E (2%) и смеси мутантов (38%), причём мутанты с заменами аспарагиновой кислоты (D) на глицин (G) и аспарагин (N) обладали повышенным сродством к α2-3-сиалозидам (см. табл. 2) [17].

С 2009 по 2011 г. была изучена РС более 100 штаммов, выделенных от больных и секционного материала за 2 эпидемических сезона. Замены были выявлены у 88,5% пациентов, скончавшихся от летальной первичной вирусной пневмонии, и у 15,5% пациентов с благоприятным исходом заболевания. Замены D222G составили 16,3%, D222N – 3,9%, D222E – 1,6% и D222V – 1%; 11,6% от проверенных штаммов соста-

Таблица 2

Усреднённые результаты анализа сродства штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09 к каждому из 9 сиалогликополимеров (СГП) в 2009–2016 гг.

Аминокислотные замены	Вклад СГП в рецепторную специфичность вируса, %									$W_{3/6}$
	3'SL	3'SLN	Su-3'SLN	SLe ^a	SLe ^c	SLe ^x	6'SL	6'SLN	Su-6'SLN	
Замен нет* 222D, 223Q (2009–2010 гг.)	9,03	8,88	11,23	10,72	9,03	6,99	14,39	14,72	14,99	0,639
Замен нет** 222D, 223Q (2009–2016 гг.)	10,98	9,50	13,34	11,09	9,30	8,55	7,25	12,75	16,66	1,149
222G, 223Q	12,46	12,18	14,08	10,98	10,55	7,94	8,41	9,71	13,68	1,417
222N, 223Q	11,18	14,09	15,75	8,64	9,51	7,26	4,81	11,51	15,84	1,807
222G + N; 223Q	12,24	11,49	13,45	11,06	11,65	9,19	7,12	10,73	13,32	1,387
222D, 223R	13,09	13,05	12,71	11,28	9,91	6,02	8,40	12,06	13,59	1,324
222D/G, 223R	12,65	13,51	13,44	11,64	9,80	7,08	7,13	12,50	12,22	1,404
222E, 223Q	9,28	8,37	10,81	11,22	9,3	7,49	15,34	14,23	13,98	0,61
222V, 223Q	10,84	11,93	16,33	13,27	10,39	10,56	6,71	10,11	9,89	1,360

Примечание. * Результаты анализа РС консенсусных штаммов (2009–2010 гг., носоглоточные смывы); ** результаты анализа РС вирусов, не содержащих замен в 222-й и 223-й позициях субъединицы HA1 (2009–2016 гг.).

Таблица 3
Сродство вируса гриппа A/California/07/2009 ($W_{3/6} = 1,139$)
к каждому из 9 сиалогликополимеров (СГП)

СГП	Вклад СГП в рецепторную специфичность вируса, %
3'SL	11,99
3'SLN	12,15
Su-3'SLN	14,35
SLe ^a	9,45
SLe ^c	10,01
SLe ^x	5,97
6'SL	13,38
6'SLN	7,83
Su-6'SLN	14,87

вили вирусы с заменой в 223 позиции HA1 глутамин на аргинин (Q223R) [18].

Со временем существенно возросло число штаммов с аминокислотными заменами в РСС гемагглютинина вируса. Всего с 2009 по 2016 г. была изучена РС более 250 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (см. табл.2). В подтверждение литературных данных, чаще всего встречается замена в 222-й позиции HA1 вируса аспарагиновой кислоты на глицин (D222G) [13–25]. Такой замене соответствует $W_{3/6} = 1,417$ (см. табл. 2), что говорит о преобладании $\alpha 2$ -3-РС за счёт повышения сродства мутантного вируса к синтетическим аналогам с $\alpha 2$ -3'-связью и снижения сродства к $\alpha 2$ -6'-СГП. Аналогичные результаты получены Yan Liu и соавт. [25]: они наблюдали заметную разницу в РС 222D

и 222G вирусов по отношению к $\alpha 2$ -3-сиалозидным последовательностям. Вирусы с 222D относительно слабо взаимодействовали с $\alpha 2$ -3-сиалозидами и присоединялись в основном к модифицированным фукозой $\alpha 2$ -3-сиалозидам (SLe^a и SLe^x) или содержащим сульфатированный остаток N-ацетилглюкозамина (Su-GlcNAc). Напротив, 222G мутанты, как и в наших исследованиях, более сильно связывались не только с $\alpha 2$ -3-модифицированными последовательностями, но и с несulfатированными и не содержащими фукозу $\alpha 2$ -3-сиалозидами (см. табл. 2). Все исследованные этими авторами пандемические вирусы сильнее связывались с последовательностью 6Su-SLe^x, чем с не содержащей остатка Su. Это свойство характерно для высокопатогенных вирусов гриппа птиц [26].

Замена аспарагиновой кислоты на аспарагин (D222N) приводит к повышению сродства к 3'SL- и 3'SLN-СГП и значительному его снижению к 6'SL- и 6'SLN-СГП ($W_{3/6} = 1,807$, см. табл. 2). В этом случае сродство к сульфатированным СГП превышает такое для консенсусных штаммов.

Наличие аргинина вместо глутамин в положении 223 (R223Q) РСС сайта HA1 повышает усреднённый параметр $W_{3/6}$ (1,324), что связано с увеличением сродства штаммов к $\alpha 2$ -3-СГП и снижением их сродства к 6'SL- и 6'SLN-сиалозидам при сравнении с консенсусными штаммами вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (см. табл. 2). (В отдельных случаях, по результатам анализа РС содержащих такую аминокислотную замену штаммов, получали параметр $W_{3/6}$, значительно превышающий 1,5 единицы.) Похожую картину наблюдают при наличии 222D/G и 223R в РСС субъединицы HA1.

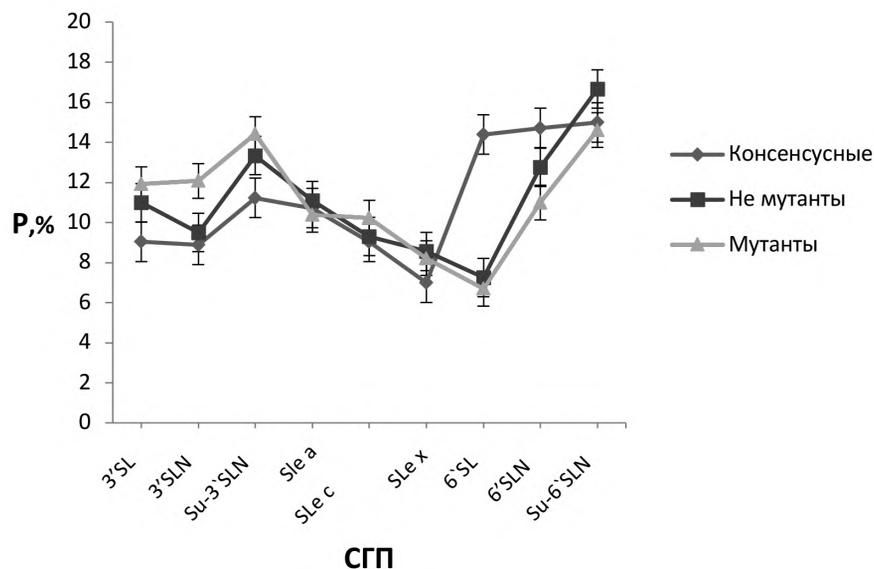


Рис. 1. Динамика рецепторной специфичности консенсусных, немутантных и мутантных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг.

Консенсусные штаммы – усреднённые результаты анализа РС вирусов от пациентов с благоприятным исходом заболевания в 2009–2010 гг.; не мутанты – усреднённые результаты за 2009–2016 гг., мутанты – усреднённые результаты 2009–2016 гг.

При замене аспарагиновой кислоты на глутаминовую (D222E) в HA1 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 профиль РС аналогичен консенсусным вирусам ($W_{3/6} = 0,610$), что характерно для штаммов гриппа человека [27–29]. Такая замена выявлена нами в материале от больных с благоприятным исходом заболевания. Аналогичное наблюдение о связи замены D222E с нелетальными случаями гриппа A(H1N1)pdm09 приведено в работах [23, 25]. Так, Yan Liu и соавт. выявили замену D222E в изоляте A/Dakar/37/2009, полученном от пациента с лёгким течением болезни [25].

Замене D222V соответствует повышение сродства мутантных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 ко всем $\alpha 2$ -3-СГП, особенно к сульфатированным и разветвлённым, и снижение такового к $\alpha 2$ -6-СГП ($W_{3/6} = 1,360$; см. табл. 2).

В единичных случаях в эпидемических сезонах 2013–2014 и 2015–2016 гг. в РСС HA1 изолятов из секционного материала пациентов, скончавшихся от летальной первичной вирусной пневмонии, методом конвекционного секвенирования была выявлена также замена D222Y, однако по ряду причин РС этих вирусов не изучена.

На рис. 1 представлены усреднённые результаты анализа динамики РС немутантных и мутантных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на протяжении 2009–2016 гг. по отношению к 9 модельным СГП в сравнении с консенсусными вирусами (за 2009–2010 гг.). Вклад каждого СГП в рецепторную специфичность вируса гриппа A(H1N1)pdm09 выражен в процентах (P) от суммарного сигнала оптической плотности, соответствующего всем 9 СГП.

Обсуждение

В начале циркуляции у штаммов вируса выявлено повышенное по сравнению с $\alpha 2$ -3- сродство ко всем 3 аналогам $\alpha 2$ -6-СГП. С 2009 по 2016 г. резко уменьшилось сродство вируса к 6'SL-СГП. В целом, усреднённый

профиль РС вирусов с аминокислотными заменами в 222-й и 223-й позициях HA1 (2009–2016 гг.) сходен с таковым для немутантных вирусов (2009–2016 гг.). При этом практически не изменилось сродство вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к разветвлённым аналогам сиалил-гликановых рецепторов: SLe^a-, SLe^c- и SLe^x-СГП (рис. 1).

Усреднённый профиль динамики сродства вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с 2009 по 2016 г. по отношению к 6 $\alpha 2$ -3- и 3 $\alpha 2$ -6-СГП представлен на рис. 2 и 3. Наблюдается тенденция к повышению сродства вируса A(H1N1)pdm09 к $\alpha 2$ -3- и снижению к $\alpha 2$ -6-СГП, причем, как следует из данных рис. 1, наибольшее сродство вирус проявляет к сульфатированным СГП.

Анализ динамики параметра $W_{3/6}$ для штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг. (рис. 4) также подтверждает тенденцию к повышению их сродства к $\alpha 2$ -3-СГП.

В 2009–2016 гг. изменение параметра $W_{3/6}$, характеризующего степень превышения $\alpha 2$ -3-РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 над $\alpha 2$ -6-РС, совпадает с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны.

Наиболее интенсивной по заболеваемости была первая волна пандемии 2009–2010 гг. [26, 30]. По мере развития пандемии стали появляться штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с повышенной вирулентностью, что было связано, в частности, с мутациями в 222-й и 223-й позициях HA1 в пределах РСС и увеличением сродства вирусов к $\alpha 2$ -3-сиалозидным рецепторам. Так, в 2009 г. усреднённый параметр $W_{3/6}$ для штаммов, изолированных из носоглоточных смывов от пациентов с благоприятным исходом заболевания, составил 0,639, тогда как для мутантных штаммов – 1,324.

Вторая волна (2010–2011 гг.), вызванная вирусом гриппа подтипа A(H1N1)pdm09, была менее интенсивной: значительно уменьшилась летальность населения РФ в целом. В 2010 и 2011 гг. $W_{3/6}$ имел близ-

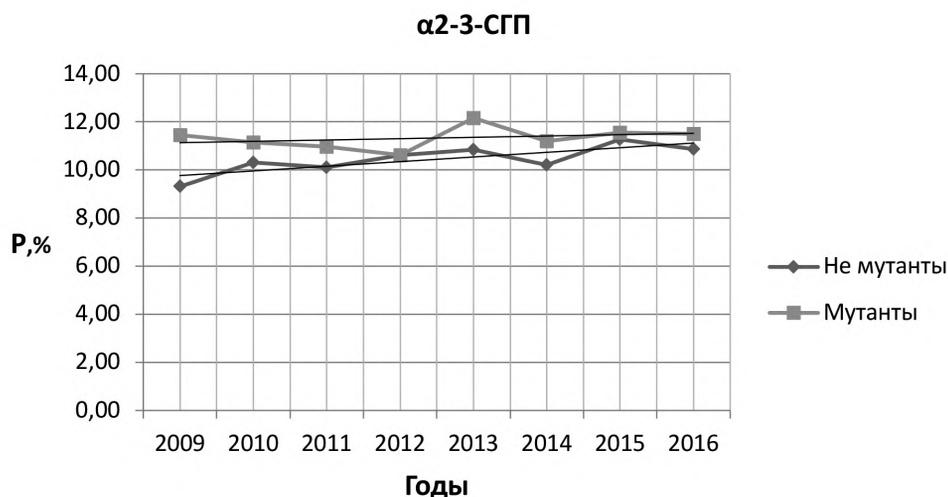


Рис. 2. Динамика сродства вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к шести $\alpha 2$ -3-СГП.

кие значения и составил для немутантных штаммов 0,948, для мутантов – 1,247.

Третья эпидемическая волна (2012–2013 гг.) была вызвана вирусами гриппа подтипа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) с преобладанием пандемического вируса. По сравнению с показателями прошлого эпидемического сезона (2010–2011) заболеваемость в 2012–2013 гг. была выше во всех возрастных группах [3, 26]. Из 42 образцов, взятых от умерших от гриппа A(H1N1)pdm09 больных, были обнаружены мутации в составе РСС HA1 – D222(N,G,Y), причем у 6 из них – D222(N,G) и Q223R. Усреднённый параметр для мутантных штаммов $W_{3/6} = 1,858$. При этом у пациентов с благоприятным исходом (142 назальных смыва и 21 штамм) такие мутации отсутствовали, но величина $W_{3/6}$ повысилась до 1,382. Это свидетельствует о значительном смещении РС этих штаммов в сторону птичьих вирусов, т.е. происходит постепенная адаптация вируса к эпителию нижних отделов респираторного тракта человека.

На пике третьей эпидемической волны в 2013 г. заболеваемость гриппом снизилась [31], что, возможно,

было обусловлено пониженной трансмиссивностью вируса A(H1N1)pdm09, обладающего повышенным сродством к $\alpha 2$ -3-рецепторам, тогда как эпителий верхних отделов респираторного тракта содержит в основном $\alpha 2$ -6-сиалозида. В 2013 г. усреднённый параметр $W_{3/6}$ для мутантных штаммов составил 1,791, для немутантных – 1,423.

К 13-й неделе 2014 г. заболеваемость гриппом в Российской Федерации снизилась до пороговых уровней [31]. Уменьшился параметр $W_{3/6}$ для мутантных (1,380) и немутантных (1,414) штаммов. При исследовании РС 11 штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, у двух из них выявлены замены D222G и Q223R в РС субъединицы HA1. Усреднённые величины $W_{3/6}$ в конце 2015 г. составляли для немутантных штаммов 1,263, для мутантных – 1,417.

В начале 2016 г. зарегистрирован резкий подъём заболеваемости гриппом A(H1N1)pdm09, его частота составила 94% [4], с большим количеством тяжёлых форм и летального исхода. В отличие от предыдущих эпидемических сезонов доминирующая роль в этиологии эпидемии принадлежала вирусу гриппа

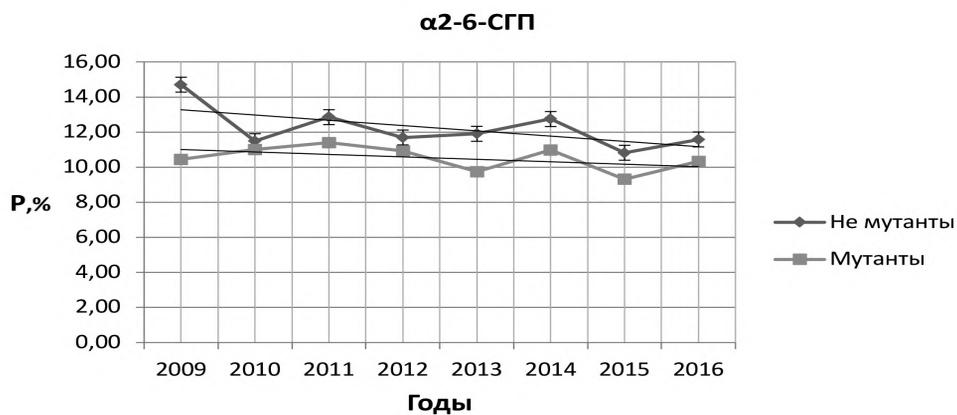


Рис. 3. Динамика сродства вируса гриппа A(H1N1)pdm09 к трём α2-6-СГП.

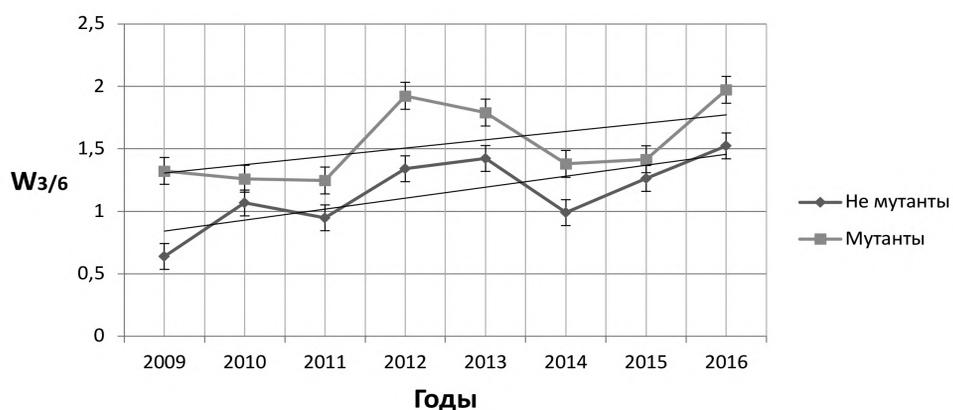


Рис. 4. Динамика параметра $W_{3/6}$ для штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009–2016 гг.

A(H1N1)pdm09. Результаты генетического анализа гемагглютинаина показали, что в 2015 г. в популяции вируса гриппа A(H1N1)pdm09 появилось 2 новых субклайда в кладе 6B (6B1 и 6B2) [32]. В декабре 2015 г. – январе 2016 г. доминирующим стал субклайд 6B1. Для него были замечены характерные замены в антигене Sa сайте HA, расположенном на глобуле белка рядом с PСС (S84N, S162N, K163Q, I121N). С заменой S162N связывают возникновение нового потенциального сайта гликозилирования, который позволяет вирусу «ускользнуть» от специфических антител после вакцинации или ранее перенесенной инфекции [33]. Нельзя исключить влияние появившихся замен на РС гемагглютинаина вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и тяжесть клинического течения в сезон 2015–2016 гг.

Результаты изучения штаммов, выделенных в 2016 г. от пациентов с благоприятными исходами (назальные смывы), не выявили аминокислотных замен в PСС, однако они обладали сродством к α 2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,246$), превышающим таковое у эталонного вируса гриппа A/California/07/2009 ($W_{3/6} = 1,139$; см. табл. 3). Вероятно, произошла эволюция пандемического вируса в направлении селекции более вирулентных пневмотропных вариантов. На это указывают усреднённая конечная величина $W_{3/6}$ для штаммов, не содержащих аминокислотных замен в позициях 222 и 223 HA1, – 1,524 (рис.4), а также результаты анализа РС 3 образцов секционного материала (bronхи и лёгкие). По результатам секвенирования выделенные штаммы не содержали аминокислотных замен в PСС, но обладали повышенным сродством к α 2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,759$). Повышенное сродство к α 2-3-сиалозидам ($W_{3/6} = 1,973$) определено также у 3 штаммов, выделенных из секционных материалов, поступивших из Оренбурга (bronхи, лёгкое) и Москвы. Анализ аминокислотных замен в последовательности HA1 в штаммах, изолированных из этих клинических образцов, выявил наличие мутаций в PСС (D222Y и D222N).

Заключение

Мониторинг РС пандемического вируса гриппа позволяет выявлять штаммы с измененной рецепторсвязывающей аффинностью к эпителию респираторного тракта человека и повышенной способностью к передаче от человека к человеку. Анализ представленных результатов показал, что изменение в 2009–2016 гг. параметра $W_{3/6}$ характеризующего степень превышения α 2-3-РС вируса гриппа A(H1N1)pdm09 над α 2-6-РС, совпадает с изменением показателей заболеваемости населения РФ пандемическим гриппом в отдельные эпидемические сезоны. Наблюдается тенденция к повышению сродства вируса A(H1N1)pdm09 к α 2-3-аналогам сиалил-гликановых рецепторов эпителия респираторного тракта человека – α 2-3-СПП, и снижению к α 2-6-аналогам, причём наибольшее сродство вирус проявляет к сульфатированным сиалогликанам. Таким образом, наш подход к выявлению связи мутаций в 222-й и 223-й позициях PСС HA1 с изменениями РС пандемического вируса гриппа, влияющими на его трансмиссивность и вирулентность, а следовательно и на пандемический потенци-

ал, важен при изучении эволюции циркулирующего в настоящее время A(H1N1)pdm09 вируса гриппа и прогнозе событий в обозримом будущем.

Благодарность. Авторы благодарны сотрудникам региональных управлений Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии», сотрудничающих с ЦЭЭГ: Новгородской, Ярославской, Владимирской, Томской, Липецкой, Пензенской, Оренбургской областей, Еврейской автономной области, Чувашской Республики, Приморского края, а также сотрудникам ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения г. Москвы за предоставление данных и образцов клинических материалов, необходимых для мониторинга циркуляции вирусов гриппа в сезоне 2016–2017 гг. в России.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 5-15, 19-21, 23-25, 27-29, 33 см. REFERENCES)

2. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю. Пандемический грипп A(H1N1) pdm09. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 542-54.
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Федоритова Е.Л., Трушакова С.В. и др. Особенности эпидемии гриппа на отдельных территориях России в эпидемическом сезоне 2012-2013гг. Доминирование штаммов вируса гриппа A(H1N1) pdm09 в странах Европы. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 5-10.
4. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В. и др. Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015-2016 гг.: доминирование вируса гриппа A (H1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 159-66.
16. Львов Д.К., Яшкулов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Шляпникова О.В., Поглазов А.Б. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютинаина в вариантах пандемического вируса гриппа A/H1N1 от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(3): 15-9.
17. 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/H1N1/sw1 в рецепторсвязывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютинаина. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(4): 4-9.
18. 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): 14-20.
22. 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 гемагглютинаина штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с помощью моноклональных антител. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 34-40.
26. Краснослободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В. и др. Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинаина вируса гриппа A(H1N1) pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией в 2012-2014 гг. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 66-71.

30. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Мальшев Н.А., Чучалин А.Г. и др. Уроки пандемии гриппа A(H1N1)pdm09 в России (2009-2011). В кн.: *Материалы научно-практической конференции «Грипп: Эпидемиология, профилактика и лечение»*. СПб.: 2011: 4-12.
31. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Феодоритова Е.Л., Трушаклова С.В. и др. Развитие эпидемии гриппа на отдельных территориях России и в странах Северного полушария в сезоне 2013-2014гг. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(5): 11-6.
32. Карпова Л.С., Сомнина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М. и др. Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(3): 19-24.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection – Mexico, March-April 2009. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2009; 58(17): 467-70.
2. L'vov D.K., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu. Pandemic influenza A(H1N1) pdm09. In: L'vov D.K., ed. *Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 542-54. (in Russian)
3. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., et al. The peculiarities of the Influenza epidemics in some areas of Russia during 2012-2013 season. The Influenza A (H1N1) pdm09 virus domination in European countries. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 5-10. (in Russian)
4. L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. Virological, epidemiological, clinic, and molecular genetic features of the influenza epidemic in 2015-2016: prevailing of the influenza A(H1N1)09 pdm virus in Russia and countries of the Northern hemisphere. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 159-66. (in Russian)
5. Gamblin S.J., Haire L.F., Russell R.J., Stevens D.J., Xiao B., Ha Y., et al. (2004) The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*. 2004; 303(5665): 1838-42. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1093155>
6. Matrosovich M., Stech J., Klenk H.D. Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev. Sci. Tech.* 2009; 28(1): 203-17.
7. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M.R., et al. Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals. *J. Virol.* 2000; 74(18): 8502-12. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.74.18.8502-8512.2000>
8. Sriwilaijaroen N., Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc. Jpn Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2012; 88(6): 226-49. Doi: <https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>
9. Rogers G.N., Paulson J.C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: difference in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*. 1983; 127(2): 361-73.
10. Rogers G.N., Pritchett T.J., Lane J.L., Paulson J.C. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology*. 1983; 131(2): 394-408.
11. Suzuki Y., Nagao Y., Kato H., Matsumoto M., Nerome K., Nakajima K., et al. Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. *J. Biol. Chem.* 1986; 261(36): 17057-61.
12. Ito T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 1998; 72(9): 7367-73.
13. Childs R.A., Palma A.S., Wharton S., Matrosovich T., Liu Y., Chai W., et al. Receptor-binding specificity of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27(9): 797-9. Doi: <https://doi.org/10.1038/nbt0909-797>
14. 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. Doi: <https://doi.org/10.2807/ese.15.09.19498-en>
15. Balraj P., Sidek H., Suppiah J., Khoo A.S., Saat Z. Molecular analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) in Malaysia associated with mild and severe infections. *Malays J. Pathol.* 2011; 33(1): 7-12.
16. L'vov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shlyapnikova O.V., Poglavov A.B., et al. Detection of amino acid substitutions of asparagine 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. 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/H1N1 swl virus in the receptor-binding site of the HA1 subunit. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(4): 4-9. (in Russian)
18. 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): 14-20. (in Russian)
19. L'vov D.K., Bovin N.V., Prilipov A.G., Bogdanova V.S., Kolobukhina L.V., Shchelkanov M.Yu., et al. HA1 receptor-binding site of A(H1N1) V among patients with lethal and not-lethal outcome in Russia (2009-2011). In: *Proceedings of International Congress of International Union of Microbiological Societies (Sapporo, Japan; September, 2-16, 2011)*, VI. Sapporo, Japan: IUMS, 2011: PO55-5.
20. 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): 11802-13. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01136-10>
21. 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. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid1605.091815>
22. 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)
23. 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. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid1706.100784>
24. WHO. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. WHO report. Available at: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/cp165_2009_2812_review_d222g_amino_acid_substitution_in_ha_h1n1_viruses.pdf
25. Liu Y., Childs R.A., Matrosovich T., Wharton S., Palma A.S., Chai W., et al. Altered Receptor Specificity and Cell Tropism of D222G Hemagglutinin Mutants Isolated from Fatal Cases of Pandemic A(H1N1) 2009 Influenza Virus. *J. Virol.* 2010; 84(22):12069-74. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01639-10>
26. Krasnoslobodtsev K.G., L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Burtseva E.I., Fedyakina I.T., Kolobukhina L.V., et al. The Polymorphism of amino acids at position 222 receptor binding site of the hemagglutinin of influenza virus A(H1N1) pdm09 in patients with fatal viral pneumonia in the 2012-2014. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 66-71. (in Russian)
27. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., L'vov D.K., Robertson J.S., et al. Specification of receptor-binding

- phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human HI and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyl)lactosamine). *Virology*. 1997; 232(2): 345-50. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8572>
28. 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.
 29. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M.R., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of HI, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000; 74(18): 8502-12. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000>
 30. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., et al. The Lessons of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in Russia (2009-2011). In: *Collection of Materials of Scientific-Practical Conference «Influenza: Epidemiology, Prevention and Treatment» [Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Gripp: Epidemiologiya, profilaktika i lechenie»]*. St. Petersburg; 2011: 4-12. (in Russian)
 31. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., et al. Influenza epidemic development in some regions of Russia and in countries of the North hemisphere during 2013-2014. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(5): 11-6. (in Russian)
 32. Karpova L.S., Sominina A.A., Burtseva E.I., Pelikh M.Yu., Feodoritova E.L., Popovtseva N.M., et al. Comparison of the influenza epidemics in Russia caused by the pandemic virus A(H1N1)pdm09 within the period from 2009 to 2013. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(3): 19-24. (in Russian)
 33. Komissarov A., Fadeev A., Petrov S., Sergeeva M., Sintsova K., Egorova A., et al. Rapid spread of influenza A (H1N1)pdm09 viruses with a new set of specific mutations in the internal genes in the beginning of 2015/2016 epidemic season in Moscow and Saint-Petersburg (Russian Federation). *Influenza Other Respir. Viruses*. 2016; 10(4): 247-53. Doi: <https://doi.org/10.1111/irv.12389>

Поступила 09.10.18

Принята в печать 31.10.18