

УДК 578.832А

Молекулярно-генетический анализ эпидемических штаммов вируса гриппа А, характеризующихся различной чувствительностью к римантадину, на основе нуклеотидной последовательности М2 белка

М. Ротанов¹, Т.В. Гребенникова^{1, 2}, Е.И. Бурцева², Е.С. Шевченко²¹Кафедра фармацевтической и токсикологической химии Российского Университета Дружбы Народов, Москва, Россия²НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва, Россия

Представлены результаты молекулярно-генетического анализа эпидемических штаммов вируса гриппа А, подтипов А(Н1N1) и А(Н3N2), выделенных в разные годы и характеризующихся различной чувствительностью к римантадину. Анализ проводили на основе последовательностей гена М2 белка вируса гриппа А. Для выявления мутаций в вирусном геноме проанализировано 15 штаммов подтипа А(Н3N2) и 16 А(Н1N1), изолированных на территории Российской Федерации с 1995 по 2007 гг. Анализ получен-

ных нуклеотидных последовательностей гена М2 белка позволил идентифицировать мутации, ответственные за резистентность к римантадину. Помимо известных мутаций, для каждого подтипа вируса были выявлены и дополнительные мутации, которые могут рассматриваться в качестве новых маркеров для идентификации штаммов, устойчивых к римантадину.

Ключевые слова: вирус гриппа А, римантадин, мутации.

Molecular and Genetic Analysis of Influenza A Viruses with Different Sensitivity to Rimantadine, Based on the M2 Protein Gene Sequence

M. Rotanov¹, T.V. Grebennikova^{1, 2}, E.I. Burtseva², E.S. Shevchenko²¹Department of pharmaceutical and toxicological chemistry, Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia²D.I.Ivanovsky Research Institute of Virology, RAMS, Moscow, Russia

The paper presents the results of molecular analysis of epidemic strains of influenza A in different years and within subtypes H1 and H3, manifesting different sensitivity to rimantadine. Analysis was performed on the influenza A virus M2 protein gene sequence. In order to detect mutations in the viral genome, analysis was performed on 15 strains of subtype A(H3N2) and 16 strains of subtype A(H1N1), isolated at the Russian Federation in

1995–2007. Analysis of registered nucleotide sequences of the M2 protein enabled to identify mutations conferring resistance to rimantadine. Apart from known mutations, additional mutations were detected for each subtype which may be considered as new markers for the identification of rimantadine-resistant strains.

Key words: influenza A virus, rimantadine, mutations.

Контактный адрес:
Марина Ротанов
Email: mrotanov@mail.ru

Введение

Грипп – острое респираторное заболевание, распространенное по всему миру, на сегодняшний день является одной из наиболее актуальных медицинских и социальных проблем [1].

Ежегодно инфекциями верхних дыхательных путей заболевают 5–15% населения земного шара, а 250–500 тыс. умирают от различных осложнений [2]. Мониторинг этиологической структуры *острых респираторных вирусных инфекций* (ОРВИ) на разных стадиях эпидемического процесса показал, что в целом по России за эпидсезон по гриппу и ОРВИ в 2006–2007 гг., по данным Минздравсоцразвития России, заболевания гриппозной этиологии составили 8,1% среди общего количества обследованных больных. В период эпидемий частота заболеваний гриппозной этиологии достигала 12–16% [3].

Возбудители гриппа – РНК-содержащие вирусы, относящиеся к роду вирусов гриппа А и В, семейства Orthomyxoviridae. Высокая контагиозность и исключительная изменчивость поверхностных белков вирусов гриппа являются причинами его повсеместного распространения.

Эпидемиологическая ситуация по гриппу особенно обострилась в последние годы, когда появились случаи заражения людей вирусом гриппа птиц. Возникновение реассортантов между вирусами птиц и людей представляет собой реальную угрозу появления нового пандемического вируса [4].

В качестве основного метода борьбы с гриппом *Всемирной Организацией Здравоохранения* (ВОЗ) рекомендована вакцинация, однако эффективность ее ограничена в связи со способностью вируса гриппа подвергаться быстрым и непредсказуемым мутациям. Кроме того, при чрезвычайных эпидемических ситуациях невелика вероятность выпуска достаточного количества вакцин для защиты всего населения. Учитывая изложенное, в условиях приближающейся пандемии, незаменимую роль в защите населения будут играть этиотропные химиопрепараты. На сегодняшний день в мире для лечения и профилактики гриппа применяются препараты адамантанового ряда (**амантадин** и **римантадин**) и ингибиторы нейраминидазы (**занамивир** и **осельтамивир**) [5]. Для терапии ОРВИ и гриппа в Российской Федерации активно применяется препарат **Арбидол**, для которого установлена эффективность в отношении вирусов гриппа А и В [6].

Препараты адамантанового ряда относятся к первому поколению препаратов, эффективных против вируса гриппа А. Амантадин, благодаря дофаминергическому действию, применяется и в качестве

противопаркинсонического средства, а для терапии гриппа в большей степени нашел применение его структурный аналог – римантадин, в силу его меньшей токсичности. Мишенью препарата является мембранный белок вируса гриппа – М2, который отвечает за локальные изменения рН, необходимые для высвобождения нуклеокапсида на различных стадиях вирусной транскрипции [7, 8]. В процессе применения возможно развитие резистентности, частота которой к 5-му дню лечения может достигать 30% [9], однако в педиатрической практике описаны случаи, в которых доля резистентных штаммов А(Н3N2) в исследуемой группе достигала 80% [10]. Кроме того, за последние годы доля естественно циркулирующих штаммов, резистентных к адамантанам, составляет порядка 100% в странах Азии и достигает 90% и более в некоторых регионах США [11]. Исследования, проведенные среди циркулирующих эпидемических штаммов вирусов гриппа А в Российской Федерации, также свидетельствуют о прогрессирующем увеличении в популяции числа штаммов, резистентных к римантадину [12].

Следует отметить, что римантадин эффективно ингибировал репродукцию 3 вариантов высоковирулентного вируса гриппа птиц А(Н5N1), выделенных в 2004 году во время вспышек гриппа в Новосибирске и Кургане от диких и домашних птиц [13].

Во всем мире ведутся систематические наблюдения за изменениями в геноме вируса, связанными с резистентностью к противовирусным препаратам. Молекулярно-генетический анализ позволяет не только дать сведения о чувствительности циркулирующих штаммов к тому или иному препарату, но и охарактеризовать эволюционные изменения в геноме вируса. Среди эпидемических штаммов, циркулирующих в Российской Федерации, данный вид наблюдения до сих пор не доступен как метод регулярного контроля за чувствительностью к противогриппозным средствам. Такая информация необходима для системного мониторинга эпидемических штаммов и является ключевым звеном в разработке эффективной тактики борьбы, как с известными, так и новыми штаммами вируса гриппа.

В данной статье представлены результаты анализа аминокислотной последовательности М2 белка эпидемических штаммов вирусов гриппа с различной чувствительностью к римантадину по данным, предварительно полученным *методом иммуноферментного анализа* (ИФА) [14].

Материал и методы исследования

Штаммы, исследованные в данной работе, были получены из Лаборатории этиологии и эпи-

демологии гриппа (ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН). Проанализировано 15 штаммов гриппа подтипа А(Н3N2) (2006-2007 гг.) и 16 А(Н1N1) (1995-2007 гг.), изолированных на территории Российской Федерации. Данные образцы также были ранее охарактеризованы методом ИФА.

Выделение вирусной РНК проводили с использованием тризола согласно методике производителя (Sigma, США).

Синтетические олигонуклеотиды. Подбор олигонуклеотидов (праймеров) проводили на компьютере Power Macintosh 6100/66 с помощью программы Amplify 1,0. Поскольку РНК сегмент, ответственный за синтез М2 белка, состоит из двух фрагментов (26 и 268 пар оснований), для проведения *полимеразной цепной реакции* (ПЦР) были подобраны 2 пары праймеров. Праймеры имели специфичные места посадки в М2 гене для штаммов обоих подтипов. Синтез олигонуклеотидных праймеров произведен в ЗАО «Синтол» (Москва).

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ/ПЦР) проводили на амплификаторе Терцик («ДНК-Технология», Россия), используя следующие параметры: 50 °С – 40 мин, 1 цикл; 95 °С – 5 мин, 52 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин, 1 цикл; 95 °С – 30 с, 52 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин, 28 циклов; 95 °С – 30 с, 52 °С – 30 с, 72 °С – 7 мин, 1 цикл. Реакционная смесь с конечным объемом 50 мкл содержала 10 мкл РНК, 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед. полимеразы TaqI (Life Technology, США), по 250 мкл каждого dNTP, 2,5 ед. обратной транскриптазы MMLV (Life Technology, США), 10 mM трис-HCl (pH 9,0 при 25 °С), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂.

Электрофорез ДНК в агарозном геле проводили, используя Трис-ацетатный буфер, содержащий этидия бромид в концентрации 0,4-0,5 мкг/мл. Гели анализировали, используя ультрафиолетовый трансиллюминатор ($\lambda=254$ нм).

Выделение ДНК фрагментов из геля проводили, используя набор реагентов фирмы Fermentas (США), согласно методике производителя.

Подготовка образцов к секвенированию проводилась на амплификаторе «Hybaid» (США), используя следующие параметры: 96 °С – 5 мин, 1 цикл; 96 °С – 30 с, 52 °С – 10 с, 60 °С – 4 мин, 25 циклов. Реакционная смесь с конечным объемом 10 мкл содержала 3,2 пмоль праймера, 2–10 нг ДНК матрицы, буфер – 5x трис-HCl (pH 9,0 при 25 °С), MgCl₂, Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, США).

Секвенирование М2 фрагмента генома штаммов проводили на автоматическом секвенаторе ABI

Prism 3130 (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ нуклеотидных и соответствующих аминокислотных последовательностей проводили с помощью специализированного программного пакета DNASTAR (DNASTAR Inc., США).

Результаты исследования

По данным литературы, на сегодняшний день для штаммов, резистентных к римантадину, известны аминокислотные замены в следующих положениях гидрофобной области М2 белка: 26, 27, 30, 31, 34 [15, 16]. В табл. 1 представлены результаты секвенсов изученных нами штаммов.

Из общего числа эпидемических штаммов, полученных для анализа, резистентностью обладало 23,5% А(Н1N1) и 66,7% А(Н3N2) штаммов. Видно, что для всех штаммов обоих подтипов, которые по результатам ИФА оказались резистентными, выявлена замена в 31-м положении: аспарагин – серин. Известно, что эта замена является наиболее частой для штаммов, резистентных к римантадину. Не была выявлена ни одна из ранее описанных мутаций (26-, 27-, 30- и 34-е положения). Однако для каждого подтипа вируса выявлены замены, которые встречаются совместно с мутацией в 31-м положении. В табл. 2 представлены участки выравнивания аминокислотных последовательностей штаммов подтипа А(Н3N2), в которых присутствуют сопутствующие замены. Очевидно, что для штаммов подтипа А(Н3N2) замена аспарагин – серин совместно встречается с заменой в 51-м положении (изолейцин – валин), что показано на примере 10 резистентных штаммов.

Для штаммов подтипа А(Н1N1) замены аспарагин/20/серин и серин/31/аспарагин являются сопутствующими в 75% случаев (табл. 3). Следует отметить, что в табл. 3 представлены только замены, выявленные у большинства чувствительных/резистентных штаммов одного подтипа, однако для каждого штамма были найдены и собственные единичные мутации. Изучение этих мутаций проводится для более углубленного исследования молекулярно-генетических основ резистентности.

Обсуждение результатов исследования

Резкое увеличение количества штаммов, резистентных к римантадину, наблюдается с 2003 года, что многие страны заставило отказаться от применения данной группы препаратов в качестве химио-профилактических и терапевтических средств для лечения гриппа А. Это в первую очередь касается США и стран Азии, где уровень резистентности к данной группе средств на сегодняшний день пре-

Таблица 1. Аминокислотные замены в штаммах А(Н1N1) и А(Н3N2), изолированных в 1995–2007 гг.

Штамм	Подтип	Характеристика штамма по результатам ИФА*	Мутации в М2 белке
А/Москва/1/95		ч	Отсутствуют
А/Москва/3/95		ч	То же
А/Москва/4/95		ч	->
А/Москва/3/98		ч	->
А/Москва/6/98		ч	->
А/Москва/8/98		ч	->
А/Москва/9/98		ч	->
А/Москва/11/98		ч	->
А/Москва/17/98	Н1N1	ч	->
А/Новгород/37/98		ч	->
А/Новгород/33/98		ч	->
А/Липецк/71/00		ч	->
А/Липецк/68/00		ч	->
А/Москва/19/07		р	Ser31Asn, Asn20Ser
А/Москва/117/07		р	То же
А/Москва/124/07		р	->
А/Москва/27/07		р	Ser31Asn
А/Москва/57/06		р	Ser31Asn, Ile51Val
А/Калининград/27/06		р	То же
А/Рост-на-Дону/1/06		р	->
А/Ставрополь/2/06		р	->
А/Москва/56/06		ч	Отсутствуют
А/Москва/60/06		ч	То же
А/Калининград/29/06		ч	->
А/Рост-на-Дону/2/06	Н3N2	ч	->
А/Липецк/68/06		ч	->
А/Москва/26/07		р	Ser31Asn, Ile51Val
А/Москва/30/07		р	То же
А/Москва/39/07		р	->
А/Москва/2/07		р	->
А/Москва/17/07		р	->
А/Москва/72/07		р	->

Примечание: * р – резистентный к римантадину штамм, ч – чувствительный к римантадину штамм.

вышает 95%. Однако последние сообщения CDC (США) по данным, обработанным на январь 2007 года, указывают на мировую тенденцию снижения количества штаммов, резистентных к римантадину, среди вирусов подтипа А(Н3N2) (92% – в 2005–2006 гг., 44% – в 2006–2007 гг.) и А(Н1N1) (15,5% – в 2005–2006 гг., 3% – в 2006–2007 гг.) [11].

Тенденция снижения чувствительности к препаратам адамантанового ряда наблюдается и среди вирусов гриппа А, циркулировавших в Российской

Федерации: 9,5% в сезоне 2002–2003 гг., 38% – в 2004–2005 гг., 44% – в 2005–2006 гг. [12]. На данный момент римантадин остается включенным в список препаратов, рекомендованных Министерством здравоохранения и социального развития в качестве основных противогриппозных средств [3]. Ясно, что целесообразность дальнейшего применения римантадина в практике здравоохранения будет определена итогами эпидемического сезона в 2007–2008 гг.

Таблица 2. Примеры аминокислотных последовательностей штаммов подтипа А(Н3N2)

Штамм	Аминокислотная последовательность	
	Позиция 31	51
А/Калиниград/27/06	PLVVAANIIGILHLILWILDRLFFKCVYRLFKHGLK	
А/Ставрополь/2/06	PLVVAANIIGILHLILWILDRLFFKCVYRLFKHGLK	
А/Москва/30/07	PLVVAANIIGILHLILWILDRLFFKCVYRLFKHGLK	
А/Москва/60/06	PLVVAASIIIGILHLILWILDRLFFKCIYRLFKHGLK	
А/Калиниград/29/06	PLVVTASIIIGILHLILWILDRLFFKCIYRLFKHGLK	
А/Липецк/68/06	PLVVAASIIIGILHLILWILDRLFFKCIYRLFKHGLK	

Таблица 3. Примеры аминокислотных последовательностей штаммов подтипа А (Н1N1)

Штамм	Аминокислотная последовательность	
	Позиция 20	31
А/Москва/124/07	WGCRCSDDSDPLVVAANIIGIVHLILWIIDRLFSKSIYR	
А/Москва/117/07	WGCRCSDDSDPLVVAANIIGIVHLILWIIDRLFSKSIYR	
А/Москва/19/07	WGCRCSDDSDPLVVAANIIGIVHLILWIIDRLFSKSIYR	
А/Липецк/71/00	WGCRCSDDSDPLVVAASIIIGILHLILWIIDRLFSKSIYR	
А/Липецк/68/00	WGCRCSDDSDPLVVAASIIIGILHLILWIIDRLFSKSIYR	
А/Новгород/37/98	WECRCNGSSDPLVVAASIIIGVMHLILWIIDRLFFKCIYR	

Мировая система контроля изменений в геноме вируса гриппа направлена на регулярный мониторинг за изменениями в генах, кодирующих синтез белков-мишеней противовирусных лекарственных средств. Первые мутации, ответственные за устойчивость к препаратам адамантанового ряда, были описаны еще в 80-х годах прошлого столетия [15–17], после чего сообщения о результатах вирусологических методов определения чувствительности к римантадину стали подкрепляться молекулярно-генетическим анализом. Важность анализа молекулярных особенностей гена М2 белка подчеркнута на последней конференции, посвященной возможностям контроля за гриппозной инфекцией в мире (Options for the Control of Influenza VI, июнь 2007, Канада).

Анализ генов основных белков-мишеней должен проводиться не только с целью определения уровня чувствительности циркулирующих штаммов к той или иной группе препаратов. Учитывая чрезвычайно высокую изменчивость вирусного генома, анализ аминокислотной последовательности должен быть направлен и на выявление новых мутаций во всех генах, которые должны сопоставляться с новыми свойствами вируса. По предварительным результатам, римантадин-устойчивые штаммы, имеющие мутацию S31N, способны более интенсивно размножаться в культуре клеток МДСК. Кроме того, определение нуклеотидной последовательности всех 8 сегментов вирусного

генома выявило, что замены в генах, кодирующих поверхностные белки вируса гриппа – нейраминидазу и гемагглютинин, встречаются совместно с мутацией S31N [18].

Новая группа препаратов, эффективных против всех подтипов вируса гриппа, в том числе и А(Н5N1), представлена ингибиторами вирусного белка – нейраминидазы. Резистентность к препаратам данной группы во всем мире находится на низком уровне – около 2% [19]. Однако при ВОЗ уже создана отдельная система наблюдения за чувствительностью к ингибиторам нейраминидазы (Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network), поскольку на данный момент *осельтамивир считается препаратом выбора при лечении людей, зараженных вирусом гриппа птиц* [20].

Полученные нами результаты представляют начальный этап мониторинга генетических особенностей эпидемических штаммов вируса гриппа, циркулирующих в Российской Федерации, который ранее не был распространенным из-за недоступности современных методов молекулярно-генетического анализа. Присутствие мутации в 31-м положении во всех штаммах, которые методом ИФА были охарактеризованы как резистентные, позволяет и в будущем считать ее основным показателем чувствительности/резистентности при молекулярно-генетическом анализе. Мутация, выявленная во всех штаммах подтипа А(Н3N2) (изолейцин/51/ валин), позволяет рассматривать

ее в качестве потенциального маркера резистентности в силу ее совместного присутствия с заменой S31N.

В дальнейшем планируется более полная молекулярно-генетическая характеристика данных штаммов, которая в первую очередь будет направ-

лена на определение аминокислотных замен в генах нейраминидазы и гемагглютинина для сопоставления их свойств применительно к эффективности основных противовирусных препаратов и идентификации новых молекулярных маркеров резистентности.

Литература

1. Грипп. Руководство для врачей. Под ред. Карпущина Г. И. СПб.: Гиппократ; 2001. - 360 с.
2. World Health Organization. Fact sheet №211; March 2003; Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en>
3. Информационное письмо Минздравсоцразвития России от 13.06.2007. № 0100/6026-07-32 «Об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ в 2006-2007 гг. и прогнозе на сезон 2007-2008 гг.»
4. Ленева И.А., Шустер А.М. Противовирусные химиопрепараты: эффективность против вирусов гриппа А подтипа H5N1. Вопросы вирусологии 2006; 5:4-7.
5. World Health Organization. WHO consultation on priority public health interventions before and during an influenza pandemic. Working group three - Antivirals-their use and availability; 2004 March 16-18; Geneva, Switzerland. Available from http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/final.pdf
6. Глушков Р.Г., Фадеева Н.И., Ленева И.А. и др. Молекулярно-биологические особенности действия Арбидола - нового противовирусного препарата. Хим.-фарм. журн. 1992; 2:8-15.
7. Ленева И.А., Глушков Р.Г., Гуськова Т.А. Лекарственные средства для химиотерапии и химиопрофилактики гриппа: особенности механизма действия, эффективность и безопасность (обзор). Хим.-фарм. журн. 2004; 11:8-14.
8. CDC. Committee on Immunization Practices (ACIP). Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory. MMWR 1997; 46:1-25. Available from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00047346.htm>
9. Hayden F.G., Belshe R.B., Clover R.D., Hay A.J., Pyke S. Emergence and apparent transmission of rimantadine-resistant influenza A virus in families. N Engl J Med 1989; 321:1696-702.
10. Shiraishi K., K. Mitamura, Y. Sakai-Tagawa, Goto H., Sagaya N., Kawaoka Y. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. J Infect Dis 2003; 188:57-61.
11. Deyde V.M., Gubareva L.V., Xu X., Shaw M, Smith C., Klimov A.I. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide (2005-2007). Options for the Control of Influenza VI Conference [Proceedings on CD ROM]; 2007 June 17-23; Toronto, Ontario, Canada; p. 230.
12. Burtseva E., Shevchenko E., Zaplatnikov A., Merkulova L., Slepshkin A. Influenza viruses sensitivity to antivirals in Russia. Options for the Control of Influenza VI Conference [Proceedings on CD ROM]; 2007 June 17-23; Toronto, Ontario, Canada; p.231.
13. Федякина И.Т., Ямникова С.С., Галегов Г.А., Львов Д. К. Действие противовирусных препаратов на репродукцию вируса гриппа птиц А/Н5, изолированного в России. Вопросы вирусологии 2005; (4):35-7.
14. Шевченко Е.С., Бурцева Е.И., Слепушкин А.Н. Спектр чувствительности к римантадину вирусов гриппа А, циркулировавших в эпидемических сезонах 2002-2004 гг. Вопросы вирусологии 2005; (5):32-5.
15. Belshe R.B., Smith M.N., Hall C.B., Betts R., Hay A.J. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. J Virol 1988; 62:1508-12.
16. Hay A.Y., Wolstenholme J., Skehel J., Smith M.N. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. EMBO J 1985; 4:3021-24.
17. Lamb R.A., Zabelde S.L., Richardson C.D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected -cell surface. Cell. 1985; 40:627-33.
18. Yi-Ying Cheng, Min-Shi Lee, Mei-Shang Ho. The Multi-country emergence of adamantane-resistant influenza A (H3) Viruses is due to a single lineage that possesses distinct internal genes. Options for the control of influenza. VI Conference [Proceedings on CD ROM]; 2007 June 17-23; Toronto, Ontario, Canada; p. 232.
19. Monto A.S., McKimm-Breschkin J.L., Macken C., et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:2395-402.
20. World Health Organization. Fact sheet Avian Influenza. 2006 February; Available from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/.