

# СРАВНЕНИЕ ГЕНОМОВ ВИРУСОВ ГРИППА А(H1N1)pdm09, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУССОДЕРЖАЩЕГО МАТЕРИАЛА

А.В. Фадеев, И.Н. Жилинская

ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** В данной работе проведено сравнение генетических последовательностей вирусов гриппа, секвенированных из клинических образцов (носоглоточных мазков) и изолятов, выделенных на клетках линии MDCK и в развивающихся куриных эмбрионах. В ходе исследования были получены данные о том, что 1–2-кратное пассирование вирусов гриппа в клетках MDCK не приводит к возникновению дополнительных мутаций в геноме вируса гриппа, и генетический материал этого вируса идентичен генетическому материалу из клинического образца. При пассировании вирусов в куриных эмбрионах в течение 1–2 пассажей генетический материал вируса отличается от генетического материала из клинического образца, так как появляются мутации в рецепторной области гемагглютинаина, приводящие к замене аминокислот (Q223R). Мутация Q223R меняет рецепторную специфичность гемагглютинаина с рецепторов человеческого типа ( $\alpha$ -2,6-сиаловые кислоты) на рецепторы птичьего типа ( $\alpha$ -2,3-сиаловые кислоты). Полученные данные совпадают с данными японских исследователей, показавших, что аналогичная замена в гене гемагглютинаина выявлена у японских штаммов вируса гриппа подтипа А(H1N1)pdm09, пассируемых в куриных эмбрионах в течение 1–2 пассажей. При дальнейшем их пассировании в куриных эмбрионах количество приобретенных адаптационных мутаций в поверхностных антигенах этих вирусов увеличивается. Таким образом, нами показано, что для генетического анализа эпидемически актуальных штаммов вирусов гриппа для рутинных задач эпидемиологического надзора использование прямого секвенирования клинических образцов, содержащих генетический материал вирусов, дает возможность получить наиболее достоверные данные, повысить их оперативность, поскольку позволяет сэкономить время, обычно затрачиваемое на вирусывыделение. В случае, если необходимо провести предварительное выделение вирусов, например, при отсутствии возможности провести полногеномную амплификацию из клинического образца (низкое содержание материала, присутствие ингибиторов полимеразной цепной реакции), оптимальным является вирусывыделение на клетках линии MDCK с минимальным количеством пассажей, что и используется в практике эпидемиологического надзора.

**Ключевые слова:** вирус гриппа А, полногеномное секвенирование, эпидемиологический надзор, гемагглютинин, адаптационные мутации, рецепторная специфичность.

## COMPARISON OF INFLUENZA A(H1N1)pdm09 GENOMES OBTAINED FROM DIFFERENT TYPES OF VIRUS-CONTAINING MATERIAL

Fadeev A.V., Zhilinskaya I.N.

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** This paper describes results of comparison of genetic sequences of influenza viruses obtained from clinical samples (nasopharyngeal swabs) and viruses isolated on MDCK cells and in developing chick embryos. The obtained data

---

### Адрес для переписки:

Фадеев Артем Викторович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова,  
15/17, ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ.  
Тел.: 8 (812) 499-15-20 (служебн.).  
E-mail: artem.fadeev@influenza.spb.ru

### Contacts:

Artem V. Fadeev  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova str.,  
15/17, Research Institute of Influenza.  
Phone: +7 (812) 499-15-20 (office).  
E-mail: artem.fadeev@influenza.spb.ru

### Библиографическое описание:

Фадеев А.В., Жилинская И.Н. Сравнение геномов вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, полученных из различных типов вирусосодержащего материала // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 292–296.  
doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-292-296

### Citation:

Fadeev A.V., Zhilinskaya I.N. Comparison of Influenza A(H1N1)pdm09 genomes obtained from different types of virus-containing material // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 292–296. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-292-296

shows that 1–2x fold passaging of influenza viruses in MDCK cells does not lead to additional mutations in the genome of the influenza virus, and the genetic material of this virus is identical to the genetic material from the clinical sample. When passaging viruses in chick embryos within 1–2 passages, the genetic material of the virus differs from the genetic material from the clinical sample, because of mutations in the receptor region of hemagglutinin, leading to aminoacid substitution Q223R. The mutation Q223R changes the receptor specificity of hemagglutinin from human-type receptors ( $\alpha$ -2.6-sialic acids) to avian receptors ( $\alpha$ -2.3-sialic acids). The data obtained coincide with the data of Japanese researchers who showed that a similar substitution in the hemagglutinin gene was detected in Japanese strains of influenza virus subtype A (H1N1) pdm09, passaged in chick embryos for 1–2 passages. With their further passaging in chick embryos, the number of acquired mutations in the surface proteins of these viruses increases. Thus, we have shown that for the genetic analysis of epidemic-relevant strains of influenza viruses for routine epidemiological surveillance tasks, the use of direct sequencing of clinical samples containing the genetic material of viruses makes it possible to obtain the most reliable data, to increase their efficiency, since it saves time normally spent on virus isolation procedure. If preliminary isolation of viruses is necessary, for example, if it is not possible to carry out full genome amplification from a clinical sample (low content of the material, presence of polymerase chain reaction inhibitors), virus isolation on MDCK cells with a minimal amount of passage is optimal, which is used in practice of epidemiological surveillance.

**Key words:** *Influenza A virus, whole-genome sequencing, epidemiological surveillance, hemagglutinin, adaptation mutations, receptor specificity.*

## Введение

Широкое внедрение методов секвенирования нового поколения в исследования генетических свойств вирусов гриппа позволяет значительно повысить производительность метода генетического анализа вирусов гриппа, а использование прямого анализа генетического материала клинических образцов вирусов гриппа открывает путь к изучению возбудителя, геном которого не несет следов адаптации к системе выделения. Кроме того, прямой генетический анализ клинических образцов без промежуточной стадии вирусывыделения позволяет повысить экономическую эффективность работы за счет отказа от трудоемких и сложных для автоматизации методов. Однако применение этих методов для этиологического надзора за циркулирующими в человеческой популяции сезонными подтипами вирусов гриппа А ставит задачу оценить равнозначность данных молекулярно-генетического анализа, полученных от первичных образцов и вирусных изолятов, выделенных на традиционных системах изоляции.

С этой целью нами проведено сравнительное исследование генетической структуры вирусов гриппа А подтипа H1N1pdm09, в клинических образцах, полученных в Санкт-Петербурге и после выделения вирусов на клетках MDCK и в развивающихся куриных эмбрионах.

## Материалы и методы

**Исследованные вирусы.** Для молекулярно-генетического анализа были использованы носоглоточные смывы от больных с ПЦР-подтвержденным гриппом А(H1N1)pdm09, полученные в Санкт-Петербурге в течение эпидемического сезона 2015–2016 гг., а также

изоляты, полученные из соответствующих первичных образцов пассированием на клетках MDCK и в развивающихся куриных эмбрионах в Лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России (табл. 1).

**Выделение РНК.** Выделение вирусной РНК из носоглоточных мазков, надосадочной культуральной жидкости и аллантоисной жидкости куриных эмбрионов проводили с использованием набора реагентов Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Полногеномная амплификация генетического материала вирусов гриппа А.** Полногеномную амплификацию генетического материала исследуемых вирусов проводили методом одноступенчатой обратной транскрипции–полимеразной цепной реакции с использованием набора реагентов SuperScript III High Fidelity RT-PCR kit (Life Technologies, США) в соответствии с протоколом Жоу и соавт. [3].

**Очистка продуктов полногеномной ПЦР.** Выделение продуктов полногеномной ПЦР из ПЦР-смеси проводили с использованием набора реагентов Qiagen Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Германия).

**Определение концентрации двуцепочечной кДНК.** Концентрацию двуцепочечной кДНК в продуктах полногеномной ПЦР определяли с использованием спектрофлуориметра Qubit и набора реагентов Qubit HS dsDNA kit (Life Technologies, США).

**Подготовка кДНК для секвенирования.** Очищенная кДНК была разведена до концентрации 0,2 нг/мкл, после чего использована для приготовления библиотеки с набором реагентов Illumina Nextera XT (Illumina, США). Для индексирования образцов был использован набор Illumina Nextera XT Index kit v2 Set A (Illumina, США).

**Таблица 1. Обозначения исследуемых вирусов**

Table 1. Designations of analyzed viruses

<b>Вирусы гриппа, анализируемые в клиническом образце (носоглоточные смывы)</b> Influenza viruses analyzed in clinical samples (nasopharyngeal swabs)	<b>Вирусы гриппа, выделенные на клетках линии MDCK</b> Influenza viruses isolated in MDCK cells	<b>Вирусы гриппа, выделенные на куриных эмбрионах</b> Influenza viruses isolated in chicken embryos
A/Saint-Petersburg/RII362S/2015 (SPB362S)	A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (C1) (SPB3 C1)	A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (E2) (SPB3 E2)
A/Saint-Petersburg/RII425S/2015 (SPB425S)	A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (C1) (SPB7 C1)	A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (E1) (SPB7 E1)
A/Saint-Petersburg/RII812S/2016 (SPB812S)	A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (C1) (SPB48 C1)	A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (E2) (SPB48 E2)
A/Saint-Petersburg/RII869S/2016 (SPB869S)	A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (C2) (SPB51 C2)	A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (E2) (SPB51 E2)

**Примечание:** к названиям штаммов, выделенных из первичных образцов на культуре клеток MDCK, добавлены буква «С» и число пассажей (1 или 2), а к названиям штаммов, выделенных из первичных образцов на куриных эмбрионах, добавлены буква «Е» и число пассажей (1 или 2).  
Note: names of isolated strains contain additional information: symbol “C” for strains isolated in MDCK cell culture, symbol “E” for strains isolated in chicken embryos and number of passages (1 or 2).

**Секвенирование.** Определение генетических последовательностей проводилось на секвенаторе Illumina MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов Illumina MiSeq Reagent kit v3 600 cycle.

**Анализ результатов секвенирования нового поколения.** Для оценки результатов секвенирования нового поколения, извлечения консенсусных последовательностей и оценки гетерогенности вирусных популяций использовалось программное обеспечение Iterative Refinement Meta-Assembler [2].

## Результаты и обсуждение

В ходе исследования были получены полные геномы исследуемых вирусов гриппа А из 4 носоглоточных смывов от больных (первичные образцы) и 8 вирусных изолятов, получен-

ных из соответствующих первичных образцов на двух различных системах выделения — клетках линии MDCK и развивающихся куриных эмбрионах. Данные секвенирования опубликованы в международной базе данных GISAID (табл. 2).

При сравнении полученных консенсусных последовательностей сегментов генома вирусов из клинических образцов с последовательностями вирусов, изолированных на клетках MDCK и в куриных эмбрионах, были выявлены нуклеотидные замены в пяти сегментах: HA, NA, PB1, PA и NP (табл. 3).

Замены нуклеотидов в сегментах PB1 (C1278T), PA (T1956A) и NP (C153T) оказались синонимичными.

В структуре генов HA и NA замены нуклеотидов приводили к замене аминокислот. Так,

**Таблица 2. Номера изолятов в базе данных GISAID**

Table 2. Isolate numbers in GISAID database

<b>Название вируса</b> Virus name	<b>Номер изолята в базе данных GISAID</b> Isolate number in GISAID database
A/Saint-Petersburg/RII362S/2015	EPI_ISL_234031
A/Saint-Petersburg/RII425S/2015	EPI_ISL_207556
A/Saint-Petersburg/RII812S/2016	EPI_ISL_207567
A/Saint-Petersburg/RII869S/2016	EPI_ISL_207571
A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (C1)	EPI_ISL_207546
A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (C1)	EPI_ISL_207550
A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (C1)	EPI_ISL_234014
A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (C2)	EPI_ISL_234015
A/Saint-Petersburg/RII03/2016 (E2)	EPI_ISL_234020
A/Saint-Petersburg/RII07/2016 (E1)	EPI_ISL_234021
A/Saint-Petersburg/RII48/2016 (E2)	EPI_ISL_234023
A/Saint-Petersburg/RII51/2016 (E2)	EPI_ISL_234031

**Таблица 3. Нуклеотидные замены в сегментах генома исследованных вирусов**

Table 3. Nucleotide substitutions in genome segments of analyzed viruses

Сегмент, позиция Segment, position	SPB362S	SPB3 C1	SPB3 E2	SPB425S	SPB7 C1	SPB7 E2	SPB812S	SPB48 C1	SPB48 E2	SPB869S	SPB51 C2	SPB51 E2
HA												
727							C	T	C			
751	A	A	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G
NA												
1161							A	A	G			
PB1												
1278							C	C	T			
2307	G	A	A									
PA												
1956	T	T	C									
NP												
153										C	C	T

в структуре гена NA замена A1161G приводила к замене аминокислоты T381A только у вируса A/Saint-Petersburg/RII48/2016 E2. У остальных вирусов мутаций в этом гене не обнаружено (табл. 4).

При анализе последовательности нуклеотидов в генах HA всех исследованных вирусов гриппа были обнаружены нуклеотидные замены только в HA вирусов, пассируемых в куриных эмбрионах — A751G. При этом, как видно из таблицы 3, эта замена оказалась идентичной и приводила к замене аминокислоты Q223R (табл. 4).

Таким образом, в ходе данной работы были получены данные о том, что 1–2-кратное пассирование вирусов гриппа в клетках MDCK не приводит к возникновению дополнительных мутаций в геноме вируса гриппа и генетический материал этого вируса идентичен генетическому материалу из клинического образца. При пассировании вирусов в куриных эмбрионах в течение 1–2-х пассажей генетический материал вируса отличается от генетического

материала из клинического образца, так как появляются мутации в рецепторной области гемагглютинаина, приводящие к замене аминокислот (Q223R). Мутация Q223R меняет рецепторную специфичность гемагглютинаина с рецепторов человеческого типа ( $\alpha$ -2,6-сиаловые кислоты) на рецепторы птичьего типа ( $\alpha$ -2,3-сиаловые кислоты). Полученные данные совпадают с данными японских исследователей, показавших, что аналогичная замена в гене гемагглютинаина выявлена у японских штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, пассируемых в куриных эмбрионах в течение 1–2 пассажей. При дальнейшем их пассировании в куриных эмбрионах количество мутаций в HA этих вирусов увеличивается [1].

Нами показано так же, что для генетического анализа эпидемически актуальных штаммов вирусов гриппа использование прямого секвенирования клинических образцов, содержащих генетический материал вирусов, дает возможность получить наиболее достоверные данные, повысить их оперативность, поскольку позволяет эко-

**Таблица 4. Аминокислотные замены в поверхностных белках исследованных вирусов**

Table 4. Aminoacid substitutions in surface proteins of analyzed viruses

Белок, позиция Protein, position	SPB362S	SPB3 C1	SPB3 E2	SPB425S	SPB7 C1	SPB7 E2	SPB812S	SPB48 C1	SPB48 E2	SPB869S	SPB51 C2	SPB51 E2
HA												
215							A	V	A			
223	Q	Q	R	Q	Q	R	Q	Q	R	Q	Q	R
NA												
381							T	T	A			

номить время, обычно затрачиваемое на вирус-выделение. В случае, если необходимо провести предварительное выделение вирусов, например, при отсутствии возможности провести полногеномную амплификацию из клинического образ-

ца (низкое содержание материала, присутствие ингибиторов ПЦР), оптимальным является вирусыведение на клетках MDCK с минимальным количеством пассажей, что и используется в практике эпидемиологического надзора.

## Список литературы/References

1. Ramadhany R., Yasugi M., Nakamura S., Daidoji T., Watanabe Y., Takahashi K., Ikuta K., Nakaya T. Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus. *Front. Microbiol.*, 2012, vol. 3, p. 128. doi: 10.3389/fmicb.2012.00128
2. Shepard S.S., Meno S., Bahl J., Wilson M.M., Barnes J., Neuhaus E. Viral deep sequencing needs an adaptive approach: IRMA, the iterative refinement meta-assembler. *BMC Genomics*, 2016, vol. 17, p. 708. doi: 10.1186/s12864-016-3030-6
3. Zhou B., Wentworth D.E. Influenza A virus molecular virology techniques. *Methods Mol. Biol.*, 2012, vol. 865, pp. 175–192. doi: 10.1007/978-1-61779-621-0\_11

---

### Авторы:

**Фадеев А.В.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;  
**Жилинская И.Н.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатории системной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

### Authors:

**Fadeev A.V.**, Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Zhilinskaya I.N.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of System Virology, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 16.06.2017  
Принята к печати 27.06.2017

Received 16.06.2017  
Accepted 27.06.2017