

Передача штамма пандемического вируса (H1N1) 2009, несущего мутацию D222G в гемагглютинине

Simona Puzelli, ✉Marzia Facchini, Domenico Spagnolo, Maria A. De Marco, Laura Calzoletti, Alessandro Zanetti, Roberto Fumagalli, Maria L. Tanzi, Antonio Cassone, Giovanni Rezza, Isabella Donatelli, и Группа надзора за вирусом пандемического гриппа А (H1N1) 2009 в Италии¹

Принадлежность авторов: Национальный институт здравоохранения, Рим Италия (S. Puzelli, M. Facchini, D. Spagnolo, M.A. De Marco, L. Calzoletti, A. Cassone, G. Rezza, I. Donatelli); Università degli Studi di Milano, Milan, Italy (A. Zanetti); Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milan (R. Fumagalli) и Università degli Studi di Parma, Parma, Italy (M.L. Tanzi)

<http://www.cdc.gov/eid/content/16/5/863.htm>

Реферат

Штамм пандемического вируса (H1N1) 2009, несущий мутацию D222G, был выявлен у тяжелобольного мужчины и переданся контактировавшему с ним человеку из его домашнего окружения. У контактировавшего с больным человека развилась лишь легкая форма заболевания, несмотря на то, что он страдал ожирением и диабетом. Выделенный вирус полностью реагировал с антисывороткой к пандемическому вакцинному штамму.

20 ноября 2009 года Норвежский институт здравоохранения доложил Всемирной организации здравоохранения о мутации в гемагглютинине (ГА) пандемического вируса (H1N1) 2009, состоящей в замене аспарагиновой кислоты (D) глицином (G) в аминокислоте 222. Мутация была выявлена у 3 пациентов (первые 2 летальных случая в стране и 1 пациент с тяжелой пневмонией) среди ≈70 других пациентов с пандемическим гриппом (H1N1) 2009; это позволяет предположить, что она не была широко распространена в Норвегии (1). Эта мутация была выявлена также в Бразилии, Китае, Японии, Мексике, Украине, Соединенных Штатах и Испании (1,2).

Мутация D-to-G в вариантах вируса гриппа 1918 года (3) была связана с переходом от предпочтения сиаловой кислоты со связью α2-6 к специфичности двойной связи α2-3/α2-6. Однако неизвестно, может ли такая мутация изменить специфичность связывания с рецептором в пандемическом вирусе (H1N1) 2009.

Хотя несколько пандемических штаммов вируса (H1N1) 2009, имеющих эту мутацию, были выявлены в летальных случаях, эта же мутация иногда выявлялась при легкой форме заболевания; и, наоборот, в вирусах, выделенных в многочисленных летальных случаях, одни и те же мутации не выявлялись. Таким образом, остается неясным клиническое значение данного открытия, как и его значение для здравоохранения в целом. По-видимому, мутация происходит спорадически и спонтанно. Не было обнаружено связей между немногочисленными пациентами, инфицированными мутировавшим вирусом, и мутация, по-видимому, не распространялась (4). На основе результатов ретроспективного анализа последовательности гемагглютинина 1, проведенного на изолятах пандемического вируса (H1N1) 2009 в Италии, мы сообщаем о случае передачи этого вируса, несущего мутацию D222G.

Исследование

Мы провели повторное исследование последовательностей гемагглютинина 130 штаммов вируса гриппа А (H1N1), выявленных у пациентов, зараженных пандемическим вирусом (H1N1) 2009. Также были проанализированы последовательности нейраминидазы некоторых из этих вирусов.

Все 130 штаммов были получены из клинических проб (мазков из носовой полости, зева или носоглотки и/или трахеальных аспиратов), собранных в период с мая по ноябрь 2009 года в рамках вирусологического надзора, проводимого Национальным центром гриппа в сотрудничестве с сетью региональных лабораторий. Эти пробы были получены для исследования эволюции пандемического штамма. 41 последовательность гена гемагглютинаина, изученная в данном исследовании, была взята из Национального центра биотехнологической информации, 3 - из базы данных Глобальной инициативы по обмену данными о гриппе птиц и 86 последовательностей гемагглютинаина (47 непосредственно из клинических проб и 39 из супернатанта культуры клеток) были получены в Национальном центре гриппа (НЦГ) с помощью следующей процедуры. Вирусные РНК были экстрагированы с помощью набора для выделения РНК QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Santa Clara, CA, USA) и амплифицированы посредством ПЦР с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) (5). Ампликоны гемагглютинаина были секвенированы с помощью набора BigDye Terminator Cycle-Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) и секвенатора ДНК ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Все последовательности НЦГ были депонированы в базе данных GenBank под инвентарными номерами, указанными на [Рисунке](#). Последовательности были собраны и выровнены с помощью пакета программ Lasergene, версия 4.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA). Программное обеспечение BioEdit, версия 4.0 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) из пакета программ MEGA (www.megasoftware.net) использовалось для оценки филогений из нуклеотидных последовательностей и построения филогенетических деревьев с использованием алгоритма ближайших соседей и метода максимального правдоподобия.

Рисунок

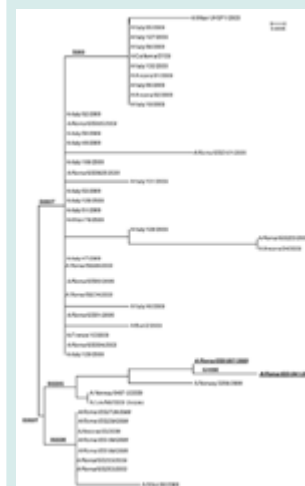


Рисунок. Филогенетические взаимоотношения последовательностей гемагглютинаина (ГА) 1 итальянских пандемических вирусов (H1N1) 2009, полученных из Национального центра гриппа (НЦГ)–Istituto Superiore di Sanità (ISS) и Национальном центре биотехнологической информации ...

Среди 130 пациентов, 23 из которых имели тяжелое (т.е. требующее госпитализации) заболевание, только 1 был инфицирован вирусом, имеющим замену D222G. У пациента, мужчины 25 лет из северной Италии, 17 августа началось лихорадочное заболевание. Через неделю он был госпитализирован в отделение интенсивной терапии с тяжелой пневмонией и острым респираторным дистресс-синдромом, которые прошли после экстракорпоральной мембранной оксигенации. Геном вируса гриппа А (H1N1) с мутацией D222G был идентифицирован путем прямого секвенирования мазка из носоглотки и трахеального аспирата, взятых 27 августа. Ни одна последовательность не была выделена из мазка, взятого в тот же день из носовой полости, и ни одна последовательность не дала положительного результата при тестировании на пандемический вирус (H1N1) 2009 с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Роста вируса не наблюдалось при посеве обеих клинических проб на клетки MDCK .

С целью выявления возможных цепей передачи мутировавшего вируса мы исследовали геном вирусного штамма, обнаруженного в мазке из горла отца индексного пациента, 55 лет, страдавшего ожирением и диабетом. 25 августа у него началось заболевание умеренной тяжести, но госпитализации или лечения противовирусными препаратами не потребовалось. Вирус, выделенный в клетках MDCK из пробы, взятой 27 августа, имел ту же мутацию D222G в гемагглютинине. Вирусные штаммы от индексного пациента и контактировавшего с ним человека были чувствительны к озельтамивиру, что определялось по отсутствию специфического маркера устойчивости к озельтамивиру (His274Tyr, присвоен N2) в последовательностях нейраминидазы, идентичных в обоих вирусных штаммах. Все дополнительно исследованные пробы, взятые от лиц, близко контактировавших с двумя пациентами (т.е. 4 медицинских работников, 4 членов семей и 2 друзей), дали отрицательный результат анализа на пандемический вирус (H1N1) 2009.

Сравнение 2 последовательностей гемагглютинаина 1 от индексного пациента и его отца выявило во второй из них дополнительную замену (G155E), расположенную поблизости от «кармана» связывания рецептора. Кроме того, анализы последовательностей показали, что все штаммы вируса, содержащие замену в позиции 222 гемагглютинаина 1 (D222G или D222E), также имели вторую замену в позиции 203 (D203T) в отличие от вакцинного штамма A/California/7/2009 ([Рисунок](#)). Однако влияние этой второй мутации на характер связывания рецептора гемагглютинаина до сих пор неясно. Гены гемагглютинаина 1 от индексного пациента и человека, контактировавшего с ним, имели 2 общие дополнительные нуклеотидные замены, 1 синонимичную замену (T504C, присвоен N1), не обнаруженную ни в одной другой последовательности, изученной в данном исследовании, и еще одно изменение в нуклеотиде, приводящее к аминокислотной замене (P297S, присвоен N1), выявленной лишь в небольшом количестве последовательностей из Италии. Тестирование выделенного вируса на основе ингибирования гемагглютинаина не выявило существенного снижения его способности реагировать с антисывороткой к пандемическому вакцинному штамму (H1N1) 2009, по сравнению с реактивностью штамма вируса гриппа A/California/7/2009, не несущего мутации G155E ([Таблица](#)).

Выводы

Идентификация штамма пандемического вируса (H1N1) 2009, несущего мутацию D222G, и его связь с первыми летальными случаями гриппа в Норвегии, вызвали некоторое беспокойство по поводу возникновения вирусного штамма с возросшей паготенностью. Данные о возможности передачи этого и других вариантов, несущих мутацию D222G, время от времени выявляемых в различных странах мира, не поступало. Наши данные позволяют предположить наличие некоторой степени трансмиссивности у вируса с мутацией D222G. Однако был выявлен ряд случаев тесного контакта, за которыми не последовало инфицирования.

Остается неясным, может ли мутировавший вирус обладать меньшей степенью приспособленности к рецепторам, находящимся в верхних дыхательных путях, а от этого зависит его передача. Кроме того, мутация, впервые обнаруженная у тяжелобольного мужчины, передалась члену семьи (отцу), у которого развилась лишь легкая форма заболевания, несмотря на риск возникновения тяжелой инфекции. Последовательность гемагглютинаина 1, выявленная в последнем случае, содержала дополнительную аминокислотную замену (G155E), которая не была обнаружена ни в одной другой последовательности, изученной в нашем исследовании, и принадлежала к числу редко выявляемых из всех последовательностей, имеющихся в базе данных GenBank. Недавно полученные данные позволяют предположить, что аминокислотная замена в этой позиции может иметь большое значение для переключения со специфичности связывания двойной связью $\alpha 2-3/\alpha 2-6$ к связи $\alpha 2-6$ (6), которая предпочтительнее распознается вирусами человеческого гриппа и экспрессируется преимущественно в верхних дыхательных путях. Это изменение отчасти могло обусловить заболевание гриппом в более легкой форме, начавшееся у отца индексного пациента. Кроме того, мутация G155E в полученных в лаборатории вариантах пандемического вируса (H1N1) 2009 была связана с потерей антигенности (7). В нашем исследовании природные изоляты вируса, несущего обе мутации G155E и D222G, обладали антигенностью, сравнимой с антигенностью вакцинного штамма A/California/7/09. Наконец, наши данные не подтверждают предположения о связи мутации D222G с тяжелым заболеванием.

Благодарность

Мы благодарим Tiziana Grisetti за редактирование рукописи и F. Fazio за поддержку.

Данное исследование частично финансировалось за счет гранта Министерства здравоохранения Италии.

Dg Puzelli – биолог-исследователь в Отделении инфекционных, паразитарных и иммунных заболеваний Национального института здравоохранения, Рим, Италия. Сфера ее научных интересов включает молекулярные механизмы генетической изменчивости вирусов гриппа и чувствительности к противовирусным препаратам.

Ссылки

1. World Health Organization. Public health significance of virus mutation detected in Norway. Pandemic (H1N1) 2009. Briefing note 17 [cited 2009 Nov 20]. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/briefing_20091120/en
2. European Centre for Disease Prevention and Control Daily Update. Pandemic (H1N1) 2009 [cited 2009 Nov 30]. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Documents/091130_Influenza_AH1N1_Situation_Report_0900hrs.pdf
3. Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol.* 2006;355:1143–55. [PubMed DOI](#)
4. World Health Organization. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses [cited 2010 Mar 22]. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_d222g/en/index.html
5. Surveillance Group for New Influenza A. [Virological surveillance of human cases of influenza A\(H1N1\)v virus in Italy: preliminary results](#). *Euro Surveill.* 2009;14:19247.
6. Takahashi T, Hashimoto A, Maruyama M, Ishida H, Kiso M, Kawaoka Y, et al. Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. *FEBS Lett.* 2009;583:3171–4. [PubMed DOI](#)
7. Chen Z, Wang W, Zhou H, Suguitan AL Jr, Shambaugh C, Kim L, et al. [Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 \(H1N1\) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs](#). *J Virol.* 2010;84:44–51.

Рисунок

Филогенетические взаимоотношения последовательностей гемагглютинаина (ГА) 1 итальянских пандемических вирусов (H1N1) 2009, полученных из Национального центра гриппа (НЦГ)–Istituto Superiore di Sanità (ISS) и Национальном центре биотехнологической информации ...

Таблица

[Таблица. Результаты теста на пандемические вирусы \(H1N1\) 2009 на основе ингибирования гемагглютинина, Италия](#)

Предлагаемый способ цитирования данной статьи

Puzelli S, Facchini M, Spagnolo D, De Marco MA, Calzoletti L, Zanetti A, et al. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. 2010 May [date cited]. <http://www.cdc.gov/EID/content/16/5/863.htm>

DOI: 10.3201/eid1605.091858