

На правах рукописи

Шиков Андрей Николаевич

**Генетическая изменчивость и антигенные свойства штаммов
пандемического вируса гриппа А (H1N1), циркулировавшего
в 2009–2010 годах на территории Российской Федерации**

03.02.02 – вирусология

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук**

Кольцово – 2013

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Научный руководитель:

Агафонов Александр Петрович,
доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Яшина Людмила Николаевна,
доктор биологических наук,
ФБУН Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
заведующая лабораторией
разработки средств ПЦР-идентификации
возбудителей 1–2 групп патогенности

Беклемишев Анатолий Борисович,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБУ «Научно-исследовательский институт
биохимии» СО РАМН, заведующий лабораторией
генной инженерии

Ведущая организация:

ФГБУН Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «06» декабря 2013 г. в 09-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 336-74-28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Автореферат разослан «1» ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Г.П. Трошкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вирус гриппа А обладает механизмами генетической изменчивости, благодаря которым вновь появившиеся варианты способны преодолевать коллективный иммунитет, сформировавшийся к прежде циркулировавшим вариантам вируса гриппа А, что выражается в периодически возникающих пандемиях гриппа. Кроме того, в настоящее время быстрому распространению вируса способствует развитие международных деловых и туристических связей между государствами (Chen, Wilson, 2008).

О новом реассортантном варианте вируса гриппа А (H1N1) стало известно в конце апреля 2009 года, когда в Мексике и США были зафиксированы первые случаи вызванного им заболевания (CDC, 2009). Распространение заболевания быстро приобрело глобальные масштабы, в связи с чем ВОЗ 11 июня 2009 года объявила о начале пандемии гриппа (WHO, 2009). Пандемия охватила более 200 стран мира, новым вариантом вируса гриппа в некоторых регионах было инфицировано от 20 до 40% населения (WHO, 2010). В августе 2010 года, на основании данных о заболеваемости, поступавших из различных регионов мира, было объявлено об окончании пандемии и начале постпандемического периода (WHO, 2010).

Молекулярно-генетические исследования, наряду с изучением биологических (антигенных) свойств вируса гриппа, являются важной составляющей мониторинга вирусной изменчивости, поскольку позволяют отслеживать появление мутаций, отвечающих за изменение антигенных, функциональных свойств вирусных белков, а также за чувствительность к противовирусным препаратам.

Цель исследования: изучение генетической изменчивости и биологических свойств штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, циркулировавшего в 2009–2010 годах на территории Российской Федерации.

Задачи исследования:

1. Исследовать клинические и секционные образцы на наличие генетического материала пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

2. Выделить штаммы пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 из клинических и секционных образцов и изучить их антигенные свойства.

3. Определить нуклеотидные последовательности генов, кодирующих вирусные белки выделенных штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, провести филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей и анализ соответствующих им аминокислотных последовательностей.

4. Провести анализ генетической гетерогенности вирусной популяции отдельных штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09.

Научная новизна и практическая значимость. Из клинического и секционного материала в период пандемии гриппа 2009–2010 годов выделены 40 штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, из которых 11 штаммов депонированы в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор».

Проведен анализ антигенных свойств 4 штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, выделенных на территории РФ в период пандемии 2009–2010 годов.

Определены нуклеотидные последовательности полноразмерных геномов у 10 штаммов вируса гриппа А (H1N1) pdm09, выделенных в период пандемии, а также последовательности генов HA и NA клинического изолята вируса гриппа А (H1N1) pdm09, выделенного в постпандемический период в 2011 году, проведен их молекулярно-генетический анализ. В международную базу данных GeneBank депонировано 96 нуклеотидных последовательностей сегментов генома выделенных штаммов вируса гриппа А (H1N1) pdm09.

Проведен детальный анализ аминокислотных последовательностей вирусных белков штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, выделенных в период пандемии 2009 года, на наличие у них детерминант патогенности и устойчивости к противовирусным препаратам.

Проведен анализ генетической гетерогенности вирусной популяции отдельных штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, выделенных в период пандемии 2009–2010 годов.

Предложены и апробированы праймеры, послужившие основой для разработки средств диагностики в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

Положения, выносимые на защиту:

1. В период пандемии гриппа 2009–2010 годов на территории Российской Федерации циркулировал вирус гриппа А (H1N1), филогенетически подобный штамму вируса гриппа А/California/04/2009(H1N1).

2. Антигенные свойства штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, циркулировавшего на территории РФ в период с апреля 2009 года по февраль 2010 года, не изменялись.

3. В гене НА штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 преобладает положительный отбор (частота несинонимичных нуклеотидных замен выше частоты синонимичных), а большинство аминокислотных замещений в НА регистрируются в антигенных эпитопах.

4. Исследованные штаммы пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 не имеют мутаций, формирующих устойчивость к препаратам из группы ингибиторов НА, но содержат аминокислотное замещение, приводящее к резистентности к препаратам адамантанового ряда.

5. Популяции выделенных штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 являются генетически гетерогенными.

Вклад автора. Первичная обработка образцов, выделение штаммов вируса гриппа из диагностического материала проводились совместно с научными сотрудниками отдела эпидемиологии ООВИ Сергеевым Ар.А. и Деминой О.К. Постановки реакции гемагглютинации и реакции торможения гемагглютинации осуществлялись совместно с научным сотрудником отдела эпидемиологии ООВИ Деминой О.К. Штаммы А/Habarovsk/01/2009(H1N1), А/Bishkek/02/2009(H1N1) и А/Omsk/04/2009(H1N1) были выделены сотрудниками отдела зоонозных инфекций и гриппа Дурымановым А.Г. и к.б.н. Шаршовым К.А. и предоставлены для молекулярно-генетических и вирусологических исследований. Выделение РНК, реакция обратной транскрипции, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией в режиме «реального времени» проводились автором, сотрудниками отдела эпидемиологии ООВИ Берилло С.А. и Сергеевой Е.И., а также сотрудницей отдела молекулярной вирусологии флавивирозов и вирусных гепатитов Семенцовой А.О. Все остальные эксперименты, включая постановку ПЦР, очистку полученных продуктов ПЦР, секвенирование и очистку продуктов секвенирования, депонирование полученных нуклеотидных последовательностей геномов вируса гриппа, их теоретический анализ, выполнены автором лично и в соавторстве с к.б.н. Терновым В.А. Консультативную и методическую помощь при выполнении отдельных этапов молекулярно-генетических исследований оказывали к.б.н. Терновой В.А. и к.б.н. Бакулина А.Ю. Общее руководство работой осуществлялось Агафоновым А.П.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, включает 17 таблиц и 13 рисунков и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, приложение, а также список литературы, состоящий из 201 источника отечественных и зарубежных авторов.

Апробация результатов диссертации и публикации. По теме диссертации опубликовано 4 научные статьи в журналах, рекомендованных

ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 1 методические рекомендации. Получен патент Российской Федерации на изобретение (№2457242 от 27 июля 2012 года).

Результаты исследований были представлены на 2-й международной конференции «Астана-Биотех 2011» (Астана, Республика Казахстан, 2011) и на конференции «Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения» (Новосибирск, 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы для исследования и выделения вирусных штаммов. Для исследования использовались носоглоточные смывы от больных и аутопсийный материал (фрагменты легочной ткани и трахеи). Все образцы были направлены в ГНЦ ВБ «Вектор» из Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 17.03.2008 года №88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» в рамках противодействия пандемии гриппа 2009–2010 годов. Все образцы были взяты с согласия пациентов или их законных представителей, исследование одобрено этическими комитетами при лечебно-профилактических учреждениях, где осуществлялся забор клинического материала.

Выделение вируса из клинического и секционного материала. Штаммы вируса гриппа были выделены путем инокуляции 100 мкл вирусосодержащего материала в аллантаоисную полость 9-суточных РКЭ (Мейхи, 1988).

Получение иммунных сывороток. Мышей стока ICR массой 15–17 г использовали для заражения выделенными штаммами пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 для получения иммунных сывороток. Сыворотки забирали на 21 сутки после интраназального введения животным под эфирным наркозом вируса в дозе 4,0–4,5 lg ЭИД₅₀/30мкл/мышь.

Определение титра противовирусных антител в сыворотке крови инфицированных мышей в РТГА. Титры антител к пандемическому вирусу гриппа А (H1N1) pdm09 в сыворотке крови инфицированных мышей определяли традиционным методом в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (Мейхи, 1988; WHO, 2002).

ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводили с использованием коммерческих наборов реагентов «РИБО-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием коммерческих наборов реагентов «РЕВЕРТА-L» (ФГУН ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя. Для ПЦР «в реальном времени» использовали наборы реагентов «АмплиСенс[®] Influenza virus A/H1-swine-FL» (ФГУН ЦНИИЭ, Россия) и собственные наборы праймеров и флуоресцентно-меченых зондов (таблица 1), специфичных к генам HA и NA пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09.

Для определения нуклеотидных последовательностей генов выделенных штаммов ПЦР проводили с праймерами, рекомендованными ВОЗ (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/sequencing_primers/en/).

Таблица 1

Последовательности праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для детекции генетического материала пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09

Ген-мишень	Название праймеров и зондов	Последовательность праймеров и зондов (5' - 3')
HA	F 111	GAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTG
	R 390	CTTTCAAATGATGACACTGAGCTCAA
	Z 231	FAM-ATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTC-BHQ1
NA	F 1232	GAACТАACAGGGCTGGATTGTATAAGA
	R 1409	TACTTGTCАATGGTAAATGGCA
	Z 1348	R6G-CAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCC-BHQ1

Секвенирование ДНК. Секвенирование проводили с наборами реагентов BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирующей реакции анализировали методом капиллярного электрофореза в автоматическом секвенаторе ABI PRISM[®] 3130xl (Applied Biosystems/Hitachi, Япония).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Филогенетический анализ проводили методами минимальной эволюции, максимального правдоподобия и присоединения соседей. Построение филогенетических деревьев выполняли в программах MEGA 5 и Lasergene 7.

Для оценки генетической неоднородности исследуемых штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 определяли частоту однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в генах HA и NA. ОНП были представлены на электрофореграммах двойными пиками флуоресценции во фрагменте ДНК, синтезируемого с одного праймера (Bouret et al., 2013). Частота ОНП была рассчитана на 1000 нуклеотидных сайтов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09

С мая 2009 года по май 2010 года проанализировано 1119 проб от 386 пациентов из 22 регионов России с подозрением на заболевание, вызванное пандемическим вирусом гриппа А (H1N1) pdm09. Методом ПЦР «в реальном времени» диагноз был подтвержден у 262 пациентов.

С мая 2009 по май 2010 года выделено 40 штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 (таблица 2), из них 18 штаммов выделены в период с мая по октябрь 2009 года. Все они были связаны с завозными случаями гриппа на территорию РФ из других стран. Остальные штаммы выделены от тяжелобольных и умерших в период с октября 2009 года по март 2010 года, когда пандемический вирус гриппа начал циркулировать непосредственно на территории РФ.

Характеристика использованных в работе штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09

№ п/п	Название штаммов	Секвенированные нуклеотидные последовательности	Дата поступления материала	Материал для исследования/течение/исход	Кол-во пассажей в РКЭ	Титр в РГА
1.	<i>A/Moscow/225/2009(H1N1)*</i>	—	25.05.2009	НС/Л/В	4	1:128
2.	A/Moscow/226/2009(H1N1)	НА, NP, М, NS	04.06.2009	НС/Л/В	4	1:64
3.	A/Moscow/227/2009(H1N1)	—	09.06.2009	НС/Л/В	3	1:16
4.	A/Moscow/228/2009(H1N1)	—	17.07.2009	НС/Л/В	3	1:8
5.	A/Moscow/229/2009(H1N1)	—	17.07.2009	НС/Л/В	3	1:8
6.	A/Tomsk/01/2009(H1N1)	Полный геном	18.07.2009	НС/Л/В	2	1:32
7.	A/Almati/01/2009(H1N1)	Полный геном	29.07.2009	НС/Л/В	4	1:16
8.	A/Irkutsk/02/2009(H1N1)	Полный геном	02.08.2009	НС/Л/В	2	1:32
9.	A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1)	Полный геном	03.08.2009	НС/Л/В	2	1:64
10.	A/Yakutsk/01/2009(H1N1)	—	03.08.2009	НС/Л/В	2	1:128
11.	A/Chelyabinsk/01/2009(H1N1)	—	06.08.2009	НС/Л/В	2	1:64
12.	A/Novgorod/01/2009(H1N1)	НА, NA	06.08.2009	НС/Л/В	2	1:32
13.	A/Orenburg/01/2009(H1N1)	Полный геном	06.08.2009	НС/Л/В	2	1:32
14.	<i>A/Kurgan/01/2009(H1N1)</i>	Полный геном	10.08.2009	НС/Л/В	2	1:128
15.	A/Omsk/01/2009(H1N1)	Полный геном	12.08.2009	НС/Л/В	2	1:128
16.	A/Chelyabinsk/02/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	04.09.2009	НС/Л/В	2	1:64
17.	A/Tula/01/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	04.09.2009	НС/Л/В	2	1:128
18.	A/Abakan/01/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	03.10.2009	НС/Л/В	2	1:128
19.	A/Chita/01/2009(H1N1)	Полный геном	31.10.2009	ТЛ/Т/С	2	1:32
20.	A/Chelyabinsk/05/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	10.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:64
21.	A/Chita/02/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	10.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:32
22.	A/Chita/03/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	10.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:32
23.	A/Abakan/02/2009(H1N1)	НА, NA	17.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:256
24.	A/Krasnoyarsk/01/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	17.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:128
25.	A/Chelyabinsk/03/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	20.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:256
26.	A/Chelyabinsk/04/2009(H1N1)	Фрагменты НА и NA	20.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:256

Продолжение таблицы 2

№ п/п	Название штаммов	Секвенированные нуклеотидные последовательности	Дата поступления материала	Материал для исследования/течение/исход	Кол-во пассажиров в РКЭ	Титр в РГА
27.	A/Habarovsk/01/2009(H1N1)**	HA, NA, M, NS	23.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:128
28.	A/Tomsk/07/2009(H1N1)	Полный геном	24.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:256
29.	A/Tomsk/08/2009(H1N1)	HA, NA	27.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:128
30.	A/Tomsk/09/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	27.11.2009	ТЛ/Т/С	2	1:64
31.	A/Bishkek/02/2009(H1N1)**	Полный геном	28.11.2009	НС/Т/В	2	1:128
32.	A/Salekhard/01/2009(H1N1)	Полный геном	01.12.2009	ТЛ/Т/С	1	1:128
33.	A/Barnaul/02/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	04.12.2009	НС/Т/В	2	1:64
34.	A/Barnaul/03/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	04.12.2009	ТЛ/Т/С	2	1:128
35.	A/Chelyabinsk/07/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	11.12.2009	ТЛ/Т/С	2	1:64
36.	A/Chelyabinsk/08/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	11.12.2009	ТЛ/Т/С	2	1:64
37.	A/Kyzyl/03/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	28.12.2009	НС/Т/В	2	1:128
38.	A/КМАО/03/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	20.01.2010	НС/Т/В	2	1:128
39.	A/КМАО/04/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	20.01.2010	НС/Т/В	2	1:64
40.	A/Ekaterinburg/09/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	21.01.2010	ТЛ/Т/С	2	1:128
41.	A/Ekaterinburg/10/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	21.01.2010	ТЛ/Т/С	2	1:128
42.	A/Omsk/04/2010(H1N1)**	Фрагменты HA и NA	17.02.2010	НС/Т/В	2	1:128
43.	A/Chelyabinsk/09/2009(H1N1)	Фрагменты HA и NA	25.03.2010	НС/Т/В	2	1:64
44.	A/Novosibirsk/01/2011(H1N1)	HA, NA	23.03.2011	НС/Т/В	—	—

Примечание: Информация, обозначенная прописными буквами: НС - носоглоточный смыв, ТЛ - ткань легкого, Л - легкое течение заболевания, Т - тяжелое течение заболевания, В - выздоровление, С - смерть; далее цифрами – количество пассажиров/титр в РГА).

* Полу жирным курсивом обозначены штаммы, использованные для анализа антигенных свойств вируса.

** Штаммы A/Habarovsk/01/2009(H1N1), A/Bishkek/02/2009(H1N1) и A/Omsk/04/2010(H1N1) прошли по 2 пассажира на культуре клеток MDCK.

Изучение антигенных свойств штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 методом РТГА

Антигенные свойства штаммов оценивали перекрестным определением титра антигемагглютинирующих антител методом РТГА в сыворотках крови мышей, инфицированных штаммами, выделенными в разные сроки в период пандемии. Титры антител в РТГА (таблица 3), полученные в результате перекрестных реакций между мышинными сыворотками к выделенным штаммам и самими штаммами, также как и со штаммом A/California/04/2009(H1N1), не имели достоверно различающихся между собой значений. В то же время значения титров антигемагглютинирующих антител в РТГА, проведенной с использованием сывороток к штаммам пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 и штаммом «сезонного» вируса гриппа, достоверно отличались от значений титров антител в этих же сыворотках в РТГА, проведенной со штаммами пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09. Аналогичные данные были получены при постановке РТГА с сывороткой к «сезонному» вирусу гриппа и со штаммами пандемического вируса гриппа: значения титров антигемагглютинирующих антител в сыворотке к «сезонному» вирусу гриппа А (H1N1) в РТГА с выделенными штаммами пандемического вируса гриппа достоверно отличались и были меньше того же значения в РТГА, проведенной со штаммом A/Novosibirsk/01/2009(H1N1) «сезонного» вируса гриппа.

Таким образом, полученный результат свидетельствует о близком антигеном родстве изучаемых штаммов между собой, их близком антигеном родстве со штаммом A/California/04/ 2009(H1N1) и в то же время об их отличии от циркулировавшего ранее вируса «сезонного» гриппа А (H1N1). Изменений антигенных свойств штаммов, выделенных в разные сроки после начала пандемии, не зарегистрировано.

Таблица 3

Антигенные свойства штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09

Специфичность сыворотки	Время выделения штамма	Титр антител в РТГА (Хср геом (I_{95})/ используемый в РТГА антиген					
		A/California/04/2009	A/Moscow/225/2009(H1N1)	A/Kurgan/01/2009(H1N1)	A/Tomsk/07/2009(H1N1)	A/Omsk/04/2010(H1N1)	A/Novosibirsk/01/2009(H1N1)*
Сыворотка против штамма A/California/04/2009	апрель 2009	527,8 (329,4–845,67)	348,2 (236,97–511,7)	303,14 (189,2–485,7)	348,2 (236,97–511,7)	527,8 (329,4–845,67)	32,99¹ (20,59–52,85)
Сыворотка против штамма A/Moscow/225/2009(H1N1)	май 2009	348,2 (236,97–511,7)	348,2 (236,97–511,7)	303,14 (189,2–485,7)	303,14 (189,2–485,7)	303,14 (189,2–485,7)	43,53² (29,62–63,96)
Сыворотка против штамма A/Kurgan/01/2009(H1N1)	август 2009	263,9 (164,7–422,8)	303,14 (189,2–485,7)	348,2 (236,97–511,7)	303,14 (189,2–485,7)	303,14 (189,2–485,7)	37,89³ (23,65–60,71)
Сыворотка против штамма A/Tomsk/07/2009(H1N1)	ноябрь 2009	263,9 (164,7–422,87)	263,9 (164,7–422,87)	303,14 (189,2–485,7)	348,2 (236,97–511,7)	263,9 (164,7–422,87)	37,89⁴ (23,65–60,71)
Сыворотка против штамма A/Omsk/04/2010(H1N1)	февраль 2010	459,47 (312,69–675,19)	348,2 (236,97–511,7)	348,2 (236,97–511,7)	303,14 (189,2–485,7)	348,2 (236,97–511,7)	32,99⁵ (20,59–52,85)
Сыворотка против штамма A/Novosibirsk/01/2009(H1N1)*	февраль 2009	37,89 (23,65–60,71)	43,53 (29,62–63,96)	37,89 (23,65–60,71)	37,89 (23,65–60,71)	37,89 (23,65–60,71)	151,57⁶ (94,7–242,85)

*Штамм «сезонного» вируса гриппа.

¹ Достоверное отличие от A/California/04/2009 при $p = 0,0001$.

² Достоверное отличие от A/Moscow/225/2009(H1N1) при $p = 0,0001$.

³ Достоверное отличие от A/Kurgan/01/2009(H1N1) при $p = 0,0001$.

⁴ Достоверное отличие от A/Tomsk/07/2009(H1N1) при $p = 0,0001$.

⁵ Достоверное отличие от A/Omsk/04/2010(H1N1) при $p = 0,0001$.

⁶ Достоверное отличие от других антигенов при $p = 0,001$.

Филогенетический анализ генов HA и NA штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09

Филогенетический анализ гена HA (рисунок 1) показал, что исследуемые штаммы и изолят A/Novosibirsk/01/2011(H1N1), выделенный в постпандемический период, не связаны с циркулировавшими ранее «сезонными» вариантами вируса гриппа А (H1N1), а также с вирусом «испанского» гриппа, которые по гену HA имеют большую степень родства с евразийскими изолятами вируса свиного гриппа А (H1N2) (субклада 2.3). Идентичность генов HA исследуемых штаммов с аналогичным геном штамма A/California/04/2009(H1N1) и между собой составляет 99%.

Сравнение нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов в субкладе 1.1 с последовательностями штаммов A/California/04/2009(H1N1) и A/swine/4/Mexico/2009(H1N1) свидетельствует об их идентичности и о том, что они имеют общее происхождение с вариантами вируса гриппа субклады 1.2, которая представлена нуклеотидными последовательностями гена HA североамериканских изолятов свиного гриппа (классический вирус свиного гриппа А (H1N1) и вирус гриппа А (H1N2)).

Филогенетический анализ гена NA (рисунок 2) показал, что исследуемые штаммы, как и штамм A/California/04/2009(H1N1), локализуются в субкладе 1.1 вместе со штаммами вируса свиного гриппа А (H1N1), выделенными в 2009 году в разных странах. Идентичность между нуклеотидными последовательностями в этой субкладе составляет больше 99%. Родственную ей субкладу 1.2 составляют евразийские изоляты вируса свиного гриппа А (H1N1).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей сегментов PB2, PB1, PA, NP, MP и NS штаммов, выделенных в период пандемии 2009 года, с аналогичными последовательностями референс-штамма A/California/04/2009(H1N1) показал их более чем 99% идентичность.

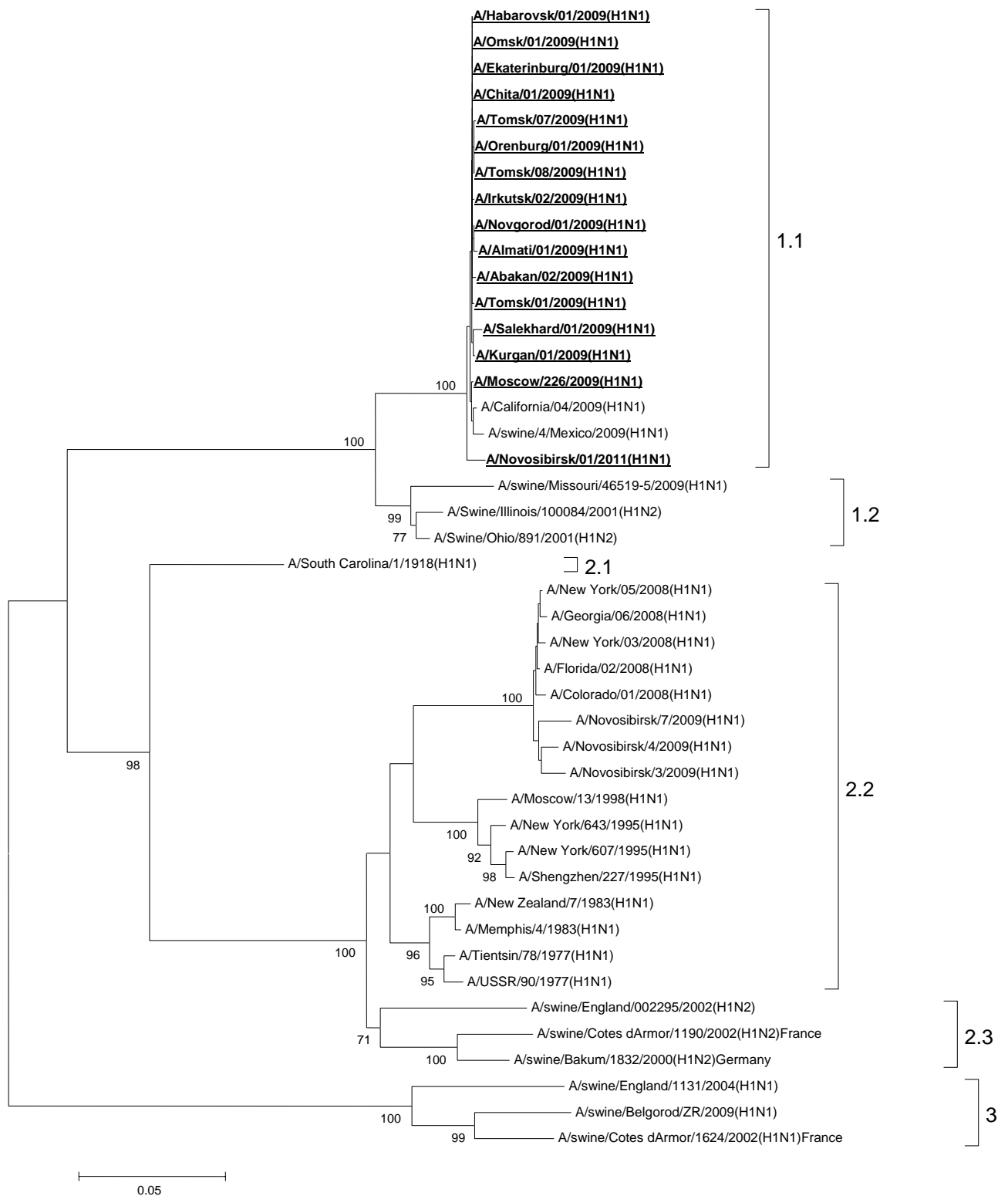


Рисунок 1. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей гена HA. Исследуемые штаммы выделены подчеркиванием. Топология дерева восстановлена при помощи метода присоединения соседей (Neighbor-Joining method) (Saitou, Nei, 1987). Матрица генетических расстояний рассчитана с применением метода Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004). Указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Филогенетический анализ проведен в программе MEGA5 (Tamura et al., 2011)

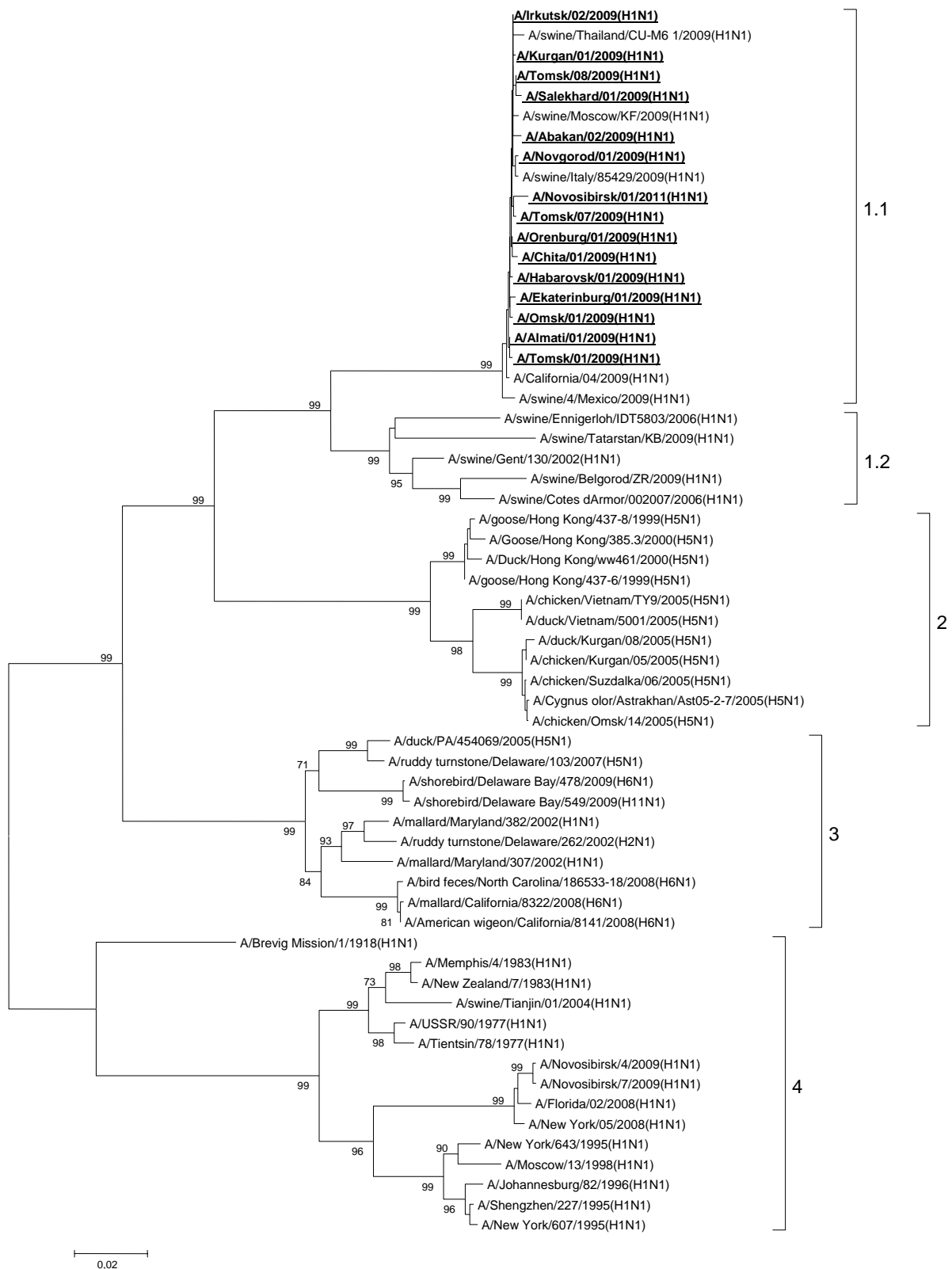


Рисунок 2. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей гена NA. Исследуемые штаммы выделены подчеркиванием. Топология дерева восстановлена при помощи метода присоединения соседей (Neighbor-Joining method) (Saitou, Nei, 1987). Матрица генетических расстояний рассчитана с применением метода Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004). Указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Филогенетический анализ проведен в программе MEGA5 (Tamura et al., 2011)

Изучение генетической изменчивости штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09

В таблице 4 представлены результаты вычисления частоты нуклеотидных замен в генах HA и NA исследуемых штаммов в сравнении с аналогичными генами штамма A/California/04/2009(H1N1).

Таблица 4

Частота нуклеотидных замен в генах HA и NA изолятов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 в сравнении с аналогичными последовательностями штамма A/California/04/2009(H1N1) (FJ966082, FJ966084)

Изоляты вируса гриппа	Частота нуклеотидных замен/ген вируса ¹					
	HA			NA		
	всего	синоним.	несиноним.	всего	синоним.	несиноним.
A/Moscow/226/2009(H1N1)	2,35	0,59	1,76	–	–	–
A/Habarovsk/01/2009(H1N1)	3,53	1,18	2,35	2,84	2,13	0,71
A/Tomsk/01/2009(H1N1)	4,12	1,18	2,94	1,42	1,42	–
A/Almati/01/2009(H1N1)	5,29	2,35	2,94	2,13	1,42	0,71
A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1)	4,12	1,18	2,94	3,55	2,13	1,42
A/Orenburg/01/2009(H1N1)	4,12	1,77	2,35	3,55	2,13	1,42
A/Irkutsk/02/2009(H1N1)	4,70	1,18	3,53	2,84	1,42	1,42
A/Novgorod/01/2009(H1N1)	4,70	1,18	3,53	4,26	2,13	2,13
A/Kurgan/01/2009(H1N1)	4,70	1,76	2,94	3,55	1,42	2,13
A/Omsk/01/2009(H1N1)	4,12	1,18	2,94	2,84	1,42	1,42
A/Chita/01/2009(H1N1)	4,12	1,18	2,94	2,84	2,13	0,71
A/Abakan/02/2009(H1N1)	6,47	2,35	4,12	5,67	2,84	2,84
A/Tomsk/07/2009(H1N1)	6,47	1,76	4,70	4,26	2,13	2,13
A/Tomsk/08/2009(H1N1)	5,29	1,76	3,53	3,55	1,42	2,13
A/Salekhard/01/2009(H1N1)	7,64	2,35	5,29	4,96	2,13	2,84
A/Novosibirsk/01/2011(H1N1)	11,76	5,88	5,88	6,38	2,13	4,25

¹ Частота нуклеотидных замен рассчитана на 1000 нуклеотидов.

У каждого из исследуемых штаммов и изолята A/Novosibirsk/01/2011(H1N1) частота нуклеотидных замен в гене HA была выше частоты нуклеотидных замен в гене NA. При этом частота возникновения несинонимичных нуклеотидных замен в гене HA в 1,25–2,99 раза выше, чем частота синонимичных замен, что свидетельствует о доминировании положительного отбора в данном участке генома. Для гена NA такая закономерность не прослеживается: для этого гена частота появления синонимичных нуклеотидных замен либо выше частоты несинонимичных, либо эти значения равны. Исключение составили штаммы

A/Kurgan/01/2009(H1N1), A/Tomsk/08/2009(H1N1), A/Salekhard/01/2009(H1N1) и A/Novosibirsk/01/2011(H1N1).

Максимальная частота нуклеотидных замен у исследованных штаммов в генах белков полимеразного комплекса PB2, PB1 и PA, а также в гене NP не превышает 3,3 замены на 1000 нуклеотидов. Для гена NS этот показатель достигает 4 нуклеотидных замен (длина гена 838 н.о.). В сегменте MP частота нуклеотидных замен может достигать 4–8 замен (длина гена 982 н.о.), однако в большинстве своем эти замены являются синонимичными.

Анализ аминокислотных последовательностей вирусных белков выделенных штаммов

Сравнение аминокислотных последовательностей HA и NA исследуемых штаммов с аналогичными последовательностями штамма A/California/04/2009(H1N1) выявило замещения аминокислотных остатков. Как показал анализ аминокислотных замещений в HA исследуемых штаммов (таблица 5), большинство их расположено в субъединице HA1 и локализуется в антигенных эпитопах A, B, D и E (Deem, Pan, 2009).

В рецептор-связывающем домене HA у штаммов A/Novgorod/01/2009(H1N1) и A/Almati/01/2009(H1N1), относящихся к случаям завоза инфекции из стран Западной Европы летом 2009 года, обнаружена мутация D222E. У штаммов A/Abakan/02/2009(H1N1), A/Tomsk/07/2009(H1N1), A/Tomsk/08/2009(H1N1), A/Salekhard/01/2009(H1N1) в этой же позиции выявлена мутация D222G, которую ряд исследователей связывает с тяжелым течением заболевания (Kilander et al., 2010; Potdar et al., 2010). Как было показано в работе Chutinimitkul S. и соавт. на мутантах пандемического вируса гриппа А (H1N1) с замещениями D222E и D222G в HA, данные мутации не приводят к повышению вирулентности вируса у мышей и хорьков, не влияют на антигенные свойства HA в РТГА с антисыворотками хорька и кролика (Chutinimitkul et al., 2010). Мутация D222G приводит к появлению двойной специфичности HA — к α -(2-6)- и к α -(2-3)- сиаловым рецепторам, что также подтверждалось сохранением у

данных мутантов способности передаваться аэрозольно у хорьков и морских свинок (Chutinimitkul et al., 2010).

Все четыре штамма, содержащие замену D222G, были выделены от пациентов, заболевание у которых закончилось летально. Однако все эти пациенты входили в группу риска, имея отягощенный анамнез (сопутствующая патология, пожилой возраст или беременность). Два штамма с мутацией D222E выделены от пациентов с легким течением заболевания.

Наибольшее количество аминокислотных замещений в НА было выявлено у штамма A/Salekhard/01/2009(H1N1). Этот штамм отличался по вирусологическим характеристикам. Он был выделен уже после первого пассажа в 9-суточных РКЭ с высокой гемагглютинирующей активностью (1:256 ГАЕ/мл), остальные используемые в работе изоляты прошли 2–4 пассажа до достижения активности 1:64–1:128 ГАЕ/мл. В аминокислотной последовательности НА штамма A/Salekhard/01/2009(H1N1) обнаружена мутация G155E, которая, согласно литературным данным, приводит к увеличению темпа репродукции вируса при культивировании в РКЭ, но в то же время снижает антигенную специфичность вируса, что делает такие мутанты непригодными для использования в качестве вакцинных штаммов (Chen et al., 2010).

В НА у всех исследованных штаммов отсутствует сайт расщепления, состоящий из нескольких основных аминокислотных остатков, отвечающий за полиорганный тропизм у высокопатогенных вирусов гриппа птиц субтипов H5 и H7.

Замещения аминокислотных остатков в НА исследуемых штаммов в большинстве своем расположены в субъединице, формирующей головку NA (91–470 а.о.). У двух штаммов замещения расположены в гипервариабельном регионе, формирующем стебель NA: N44S — у A/Novosibirsk/01/2011(H1N1) и N44D - у A/Salekhard/01/2009(H1N1).

Таблица 5

Аминокислотные замещения в HA штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 в сравнении с аналогичной последовательностью штамма А/California/04/2009(H1N1)

Название штамма(изолята)	Позиция аминокислотного остатка																			
	Сигнальный пептид	HA1																	HA2	
	3	83	86	128	143	155	162	185	195	197	203	211	222	223	234	260	321	374	441	451
A/California/04/2009(H1N1)	A	P	D	S	S	G	S	S	A	T	S	K	D	Q	V	N	I	E	N	S
A/Moscow/226/2009(H1N1)		S								A									V	
A/Habarovsk/01/2009(H1N1)		S		P						A	T									
A/Tomsk/01/2009(H1N1)		S								A	T						D		V	
A/Almati/01/2009(H1N1)		S								A	T		E						V	
A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1)		S								A	T			R					V	
A/Orenburg/01/2009(H1N1)		S								A	T								V	
A/Irkutsk/02/2009(H1N1)		S								A	T			R	I				V	
A/Novgorod/01/2009(H1N1)		S								A	T		E	R					V	
A/Kurgan/01/2009(H1N1)		S								A	T	E							V	
A/Omsk/01/2009(H1N1)		S								A	T			R					V	
A/Chita/01/2009(H1N1)		S		P						A	T								V	
A/Abakan/02/2009(H1N1)		S								A	T		G							
A/Tomsk/07/2009(H1N1)		S		P				G		A	T		G						V	
A/Tomsk/08/2009(H1N1)		S		P						A	T		G						V	
A/Salekhard/01/2009(H1N1)		S	N			E	N			A	T		G						V	D
A/Novosibirsk/01/2011(H1N1)	T	S			G			T		A	T			R					V	K N

Все исследованные штаммы не содержат аминокислотных замещений в NA, приводящих к лекарственной устойчивости к ингибиторам NA (озельтамивиру и занамивиру). Таким образом, можно предположить, что все они обладают чувствительностью к препаратам из этой группы противовирусных лекарственных средств.

В других белках у исследованных штаммов в сравнении со штаммом A/California/04/2009(H1N1) выявлено несколько аминокислотных замещений. У штаммов A/Tomsk/01/2009(H1N1), A/Chita/01/2009(H1N1) и A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1) в белках PB2 и PB1 были обнаружены сцепленные мутации: в PB1 - K353R и T566A, в PB2 - T471M, которые, по литературным данным, могут увеличивать скорость репликации вируса в культуре клеток MDCK и повышать вирулентность и патогенность вируса при заражении мышей (Xu et al., 2011).

В белке NP штамма A/Salekhard/01/2009(H1N1) обнаружено замещение V186I, расположенное на поверхности РНК-связывающей борозды молекулы NP. Согласно данным литературы эта мутация является значимой и может возникать при адаптации вируса гриппа человека к легким мыши (Ping et al., 2011).

Другие обнаруженные замещения встречаются с разной частотой у изолятов, выделенных в других странах. При этом в литературе нет данных, которые бы подтверждали влияние этих мутаций на патогенность и вирулентность вируса гриппа.

У всех исследованных штаммов синтез полноразмерного белка PB1-F2 невозможен, т.к. в альтернативной +1 открытой рамке считывания сегмента PB1, кодирующей белок PB1-F2, имеются три стоп-кодона: 12 (TAA), 58 (TAG) и 88 (TAG).

Все исследуемые штаммы, как и штамм A/California/04/2009(H1N1), в белке M2 имеют мутацию S31N, которая приводит к устойчивости к противовирусным препаратам адамантанового ряда: амантадину и римантадину (Abed et al., 2005).

Изучение генетической гетерогенности выделенных штаммов

Проанализирован характер генетической неоднородности каждого из исследованных штаммов по генам HA и NA, где определялись ОНП - полиморфные сайты, в которых на электрофореграммах регистрировались минорные нуклеиновые основания. Самым генетически неоднородным штаммом из 11 исследуемых по этим двум генам оказался A/Tomsk/01/2009(H1N1), в гене HA которого частота ОНП составила 2,94 на 1000 нуклеотидов, а в гене NA - 2,12 на 1000 нуклеотидов.

Часть минорных нуклеотидных замен являются несинонимичными и приводят к аминокислотным замещениям. В результате ОНП в молекуле NA появляются замещения: I149F у штамма A/Bishkek/02/2009(H1N1), I149L - у A/Irkutsk/02/2009(H1N1) и D259E - у A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1).

В рецептор-связывающем домене HA у штаммов A/Almati/01/2009(H1N1) и A/Tomsk/01/2009(H1N1) полиморфизм на уровне аминокислотной последовательности обнаружен в 222-й позиции (таблица 6). При реализации минорных нуклеотидных замен некоторые из аминокислотных замещений в молекуле HA2 возникают в позициях, мутации в которых потенциально могут влиять на стабильность разных конформаций белка (Li et al., 2008). Как следует из литературных данных, если замещения в позициях 45, 103 и 114 в HA2 происходят со сменой заряда, то они оказывают влияние на конформацию белка. Замещения I45V у штамма A/Almati/01/2009(H1N1) и I45F у штамма A/Kurgan/01/2009(H1N1) являются компенсаторными. Аминокислотное замещение N114D в HA2 у штаммов A/Salekhard/01/2009(H1N1) и A/Tomsk/07/2009(H1N1) происходит со сменой заряда аминокислоты, а, следовательно, может оказывать влияние на рН перехода между конформациями белка. Замещение E103K у штаммов A/Chita/01/2009(H1N1) и A/Tomsk/07/2009(H1N1), также происходящее со сменой заряда, может приводить к некоторой дестабилизации структуры белка.

Таблица 6

ОНП в гене НА, выявленные у штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, и замещения аминокислот, возникающие при реализации минорных нуклеотидных замен

Участки гена НА	Сигнальный пептид	НА1					НА2							
Позиция нуклеотида	28	384	687	716	717	774	1119	1165	1339	1372	1550	1554	1559	1665
A/California/04/2009(H1N1) (FJ966082)	T	T	G	A	T	A	G	A	G	A	T	T	T	C
A/Almati/01/2009(H1N1)		T/c		A/g 222E/G	A D222E	A/t		A/g 45I/V						
A/Bishkek/02/2009(H1N1)		T/c												
A/Chita/01/2009(H1N1)								G/a 103E/K						C/t
A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1)	T/c 10Y/H					A/t				T/a 173I/K	T/a 174D/E	T/g 176V/G		
A/Irkutsk/02/2009(H1N1)														
A/Kurgan/01/2009(H1N1)								A/t 45I/F						
A/Omsk/01/2009(H1N1)	T/c 10Y/H													
A/Salekhard/01/2009(H1N1)			G/c	G D222G						G N114D				
A/Tomsk/01/2009(H1N1)					T/a 222D/E		G/a			T/a 173I/K	T/a 174D/E	T/g 176V/G		
A/Tomsk/07/2009(H1N1)				G D222G			A	G/a 103E/K	A/g 114N/D					Y
A/Orenburg/01/2009(H1N1)							A							

Примечание: ОНП обозначены двумя буквами: прописной буквой обозначено мажорное нуклеиновое основание, строчной буквой — минорное нуклеиновое основание. Аминокислотные замещения, возникающие при реализации ОНП, обозначены жирным шрифтом: цифрой обозначена позиция аминокислотного остатка, буквой до косой черты обозначен мажорный аминокислотный остаток, буквой после косой черты — минорный аминокислотный остаток.

Большинство аминокислотных остатков, которые появляются у исследуемых штаммов в HA и NA в результате ОНП, совпадают в тех же позициях с аминокислотными остатками в HA и NA других изолятов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, штаммов вируса гриппа А (H1N1), выделенных в разные годы от свиней, и вируса гриппа А (H6N1), выделенного от птиц (таблица 7). Совпадения аминокислотных замещений, возникающих при реализации ОНП у исследуемых штаммов, с аминокислотными остатками в тех же позициях у различных штаммов вируса гриппа А могут являться результатом конвергентной эволюции нуклеотидных последовательностей вирусных геномов (Cuevasa et al., 2002; Remold et al., 2008). В то же время такие совпадения с другими изолятами пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09 свидетельствуют о способности этих мутаций в определенных условиях закрепляться в вирусной популяции.

Таблица 7

Аминокислотные замещения, возникающие в HA и NA у исследованных штаммов при реализации ОНП, и известные штаммы вируса гриппа А, имеющие эти замещения (по данным ресурса NCBI / The Influenza Virus Resource <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>).

Вирусный белок		Аминокислотные замещения, возникающие при реализации ОНП, в исследованных штаммах	Штаммы вируса гриппа А, содержащие аминокислотные замещения
NA		I149F	A/chicken/Taiwan/0824/97(H6N1), A/swine/England/WVL14/1996(H1N1), A/swine/Iowa/46519-1/2007(H1N1), A/Ohio/04/2006(H1N1)
		I149L	Нет
		K259E	A/Ekaterinburg/01/2009(H1N1) Influenza A virus H3N2
HA	Сигнальный пептид	Y10H	A/Texas/30/2009(H1N1), A/swine/Thailand/CU-RP3/2010(H1N1), A/South Carolina/AF2554/2009(H1N1), A/swine/Korea/SCJ01/2009(H1N1) и другие изоляты из Южной Кореи
	HA1	D222G	A/Abakan/02/2009(H1N1), A/Tomsk/07/2009(H1N1), A/Tomsk/08/2009(H1N1), A/Salekhard/01/2009(H1N1), A/Rio de Janeiro/7455/2009(H1N1) и многие другие изоляты пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09
		D222E	A/Thailand/CU-C1070/2010(H1N1), A/Almati/01/2009(H1N1), A/Novgorod/01/2009(H1N1)
	HA2	I45V	A/swine/Costa Rica/000125-20/2010(H1N1), A/swine/Costa Rica/000125-16/2010(H1N1) и другие изоляты из Коста-Рики
		I45F	A/HuZhou/01/2010(H1N1)
		E103K	A/Shanghai/60T/2009(H1N1)
		N114D	A/Salekhard/01/2009(H1N1)
		I173K	Нет
		D174E	A/Australia/35/2009(H1N1), A/swine/North Carolina/9647/2003(H1N1)
	V176G	Нет	

ВЫВОДЫ

1. Установлено антигенное родство между штаммами вируса гриппа А (H1N1) pdm09, выделенными в период с мая 2009 года по февраль 2010 года, и штаммом A/California/04/2009(H1N1), а также их отличие по антигенным свойствам от «сезонного» вируса гриппа А (H1N1), циркулировавшего в предпандемический период.

2. Анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных геномов 10 штаммов вируса гриппа А (H1N1) pdm09, циркулировавшего на территории РФ в 2009 году, показал, что по каждому из 8 сегментов генома они идентичны штамму A/California/04/2009(H1N1) более чем на 99%.

3. В геномах исследованных штаммов вируса гриппа А (H1N1) pdm09 частота нуклеотидных замен в гене НА выше частоты нуклеотидных замен в гене NA. При этом частота возникновения несинонимичных нуклеотидных замен в гене НА выше частоты синонимичных, что свидетельствует о доминировании положительного отбора в данном участке генома.

4. В результате анализа аминокислотных последовательностей вирусных белков установлено:

а). У всех исследованных штаммов отсутствуют в НА мутации резистентности к препаратам из группы ингибиторов НА и в белке М2 имеется замещение S31N, приводящее к резистентности к препаратам адамантанового ряда.

б). Большинство аминокислотных замещений в НА исследованных штаммов, по сравнению с НА штамма A/California/04/2009(H1N1), расположено в субъединице НА1, в антигенных эпитопах А, В, D и Е.

в). У штаммов: A/Abakan/02/2009(H1N1), A/Tomsk/07/2009(H1N1), A/Tomsk/08/2009(H1N1), A/Salekhard/01/2009(H1N1) в рецептор-связывающем домене НА выявлено аминокислотное замещение D222G,

которое приводит к появлению двойной специфичности HA к α -(2-6)- и к α -(2-3)-сиаловым рецепторам.

5. У всех исследованных штаммов в альтернативной +1 открытой рамке считывания сегмента PB1, кодирующей белок PB1-F2, установлено наличие трех стоп-кодонов, вследствие чего у них невозможен синтез полноразмерного белка PB1-F2, являющегося одним из факторов патогенности вируса гриппа А.

6. Обнаружена генетическая неоднородность внутри каждого исследуемого штамма. Анализ однонуклеотидных замен в полиморфных сайтах генов HA и NA показал, что часть из них приводит к аминокислотным замещениям, влияющим на конформацию белков. В рецептор-связывающем домене HA обнаружен полиморфизм у штамма A/Almati/01/2009(H1N1) — 222E/G и у штамма A/Tomsk/01/2009(H1N1) — 222D/E.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Онищенко Г.Г., Агафонов А.П., Демина О.К., Сергеев А.А., Терновой В.А., Шишкина Л.Н., Бормотов Н.И., Кабанов А.С., Скарнович М.О., **Шиков А.Н.**, Семенцова А.О., Шестопапов А.М., Шпынов С.Н., Ставский Е.А., Дроздов И.Г. Свойства штаммов пандемического вируса гриппа, выделенных на территории России // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. — № 101. — С. 5-9.
2. Агафонов А.П., Шестопапов А.М., **Шиков А.Н.**, Демина О.К., Дурыманов А.Г., Сергеев А.А., Агафонова П.А., Винокурова А.В., Шаршов К.А., Берилло С.А., Скарнович М.О., Семенцова А.О., Терновой В.А., Малкова Е.М., Ставский Е.А., Дроздов И.Г. Изучение свойств пандемического вируса гриппа А (H1N1), циркулировавшего на территории РФ в 2009–2010 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. — № 4. — С. 24-27.
3. **Шиков А.Н.**, Семенцова А.О., Демина О.К., Сергеев А.А., Берилло С.А., Сергеева Е.И., Винокурова А.В., Ишенина А.В., Терновой В.А., Агафонов А.П., Дроздов И.Г. Генетическая изменчивость изолятов вируса гриппа А H1N1, выделенных на территории России в 2009 году // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011. — № 4. — С. 23-29.
4. **Шиков А.Н.**, Сергеева Е.И., Демина О.К., Терновой В.А., Рябинин В.В., Костина Е.В., Малкова Е.М., Синяков А.Н.,

Агафонов А.П. Разработка ДНК-биочипа для выявления субтипов вируса гриппа А // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. – № 2(112). – С. 89-94.

Тезисы конференций:

1. **Шиков А.Н.**, Терновой В.А., Агафонов А.П., Демина О.К., Демина А.В., Семенцова А.О., Берилло С.А., Сергеева Е.И., Ишенина А.В., Винокурова А.В., Сергеев А.Н. Изучение генетического полиморфизма пандемического вируса гриппа А Н1N1 // Материалы 2-й международной конференции «Астана Биотех-2011»: Сборник научных трудов. – Астана, 2011. – С. 84.
2. **Шиков А.Н.**, Терновой В.А., Демина О.К., Семенцова А.О., Берилло С.А., Сергеева Е.И., Пьянков О.В., Михеев В.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Анализ изменчивости генов НА и NA изолятов пандемического вируса гриппа А Н1N1 // Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия человека: Сборник научных трудов. – Новосибирск, 2012. – С. 408-414.
3. Сергеева Е.И., **Шиков А.Н.**, Демина О.К., Демина А.В., Корнеев Д.В., Пьянков О.В., Терновой В.А., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Разработка набора для детекции вирусов, вызывающих острые респираторные заболевания у людей, на основе мультиплексного варианта ОТ-ПЦР в режиме реального времени // Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия человека: Сборник научных трудов. – Новосибирск, 2012. – С. 365-371.

Патент:

Патент RU 2 457 242 С1. Штамм A/Salekhard/01/2009(H1N1)v вируса гриппа для изучения лечебно-профилактической эффективности препаратов против пандемического варианта вируса гриппа А. Авторы: Агафонов А.П., Терновой В.А., Шишкина Л.Н., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Скарнович М.О., Демина О. К., Кабанов А.С., Шиков А.Н., Семенцова А.О., Сергеев А.А. Опубликовано в БИ № 21 от 27.07.2012. (Заявка № 2011124677/10, 16.06.2011).

Методические рекомендации:

Методические рекомендации «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высокопатогенными штаммами вируса гриппа А (H1N1), у людей», Москва, 2009.

Автор благодарен коллегам, участвовавшим в проведении данных исследований. Особую благодарность автор выражает к.б.н. Владимиру Александровичу Терновому и своему научному руководителю д.б.н. Александру Петровичу Агафонову.