

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

На правах рукопису

Радченко Лариса Василівна

УДК: 578.74+575.22 + 578.832.1

**АНТИГЕННА ТА ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ
ГРИПУ ЛЮДЕЙ В УКРАЇНІ У 2012-2015 РОКАХ**

03.00.06 – вірусологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор медичних наук,
старший науковий
співробітник
Міроненко А.П.

Київ – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	10
1.1. Характеристика вірусів грипу	10
1.1.1. Структура віріону та особливості вірусів грипу	10
1.1.2. Репродукція вірусу грипу в організмі хазяїна	16
1.2. Антигенна та генетична характеристика вірусів грипу	18
1.2.1. Антигени вірусів грипу людей	18
1.2.2. Генетична характеристика вірусів грипу на сучасному етапі	23
1.2.3. Дослідження мутацій в генах вірусів грипу та їх вплив на інфекційний процес	24
РОЗДІЛ 2. Методи дослідження вірусів грипу	28
2.1. Методи аналізу антигенних властивостей	29
2.2. Дослідження генетичних змін у вірусів грипу	31
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень	34
3.1. Матеріали та обладнання, використані у роботі	34
3.2. Методи досліджень	35
3.2.1. Культивування культури клітин MDCK і MDCK-SIAT	36
3.2.2. Методика зараження культури клітин MDCK і MDCK-SIAT	38
3.2.3. Постановка реакції гальмування гемаглютинації (РГГА)	39
3.2.4. Процедура виділення РНК вірусів грипу	41
3.2.5. Полімеразно - ланцюгова реакція	43
3.3. Побудова філогенетичних дерев за допомогою програми MEGA6	46
3.4. Статистична обробка результатів	46
РОЗДІЛ 4. Ідентифікація та антигенна характеристика вірусів грипу,	48

що циркулювали в Україні з 2012 по 2015 роки	
4.1. Аналіз вірусів грипу сезону 2012-2013 років	48
4.2. Аналіз вірусів грипу сезону 2013-2014 років	53
4.3. Аналіз вірусів грипу сезону 2014-2015 років	58
4.4. Антигенна мінливість вірусів грипу, виділених в 2012-2015 роках	62
4.5. Структура популяції вірусів грипу в 2012-2015 роках	66
РОЗДІЛ 5. Філогенетичний аналіз вірусів грипу людей типу А, циркулюючих в Україні з 2012 по 2015 роки	69
5.1. Генетична характеристика пандемічних вірусів грипу А(H1N1)pdm09	69
5.2. Генетична характеристика сезонних вірусів грипу А(H3N2)	85
РОЗДІЛ 6. Філогенетичний аналіз вірусів грипу типу В генетичної гілки Yamagata, виділених в Україні протягом 2012-2015 років	104
6.1 Аналіз вірусів грипу В генетичної гілки Yamagata за генами гемаглютинину (HA) та нейрамінідази (NA)	104
РОЗДІЛ 7. Порівняльний аналіз мутацій в генах HA та NA вірусів грипу в сезонах 2012-2015 років	121
7.1. Характеристика мутацій вірусів грипу типу А(H1N1)pdm09	121
7.2. Характеристика мутацій вірусів грипу типу А(H3N2)	124
7.3. Характеристика мутацій вірусів грипу типу В генетичної гілки Yamagata	127
УЗАГАЛЬНЕННЯ	131
ВИСНОВКИ	143
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	145

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АК	– амінокислота
ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я
ГРВІ	– гостра респіраторна вірусна інфекція
ІХА	– імунохроматографічний аналіз
КК	– культура клітин
ПЛР	– полімеразно-ланцюгова реакція
РГГА	– реакція гальмування гемаглютинації
РНК	– рибонуклеїнова кислота
ЦПД	– цитопатична дія
BLAST	– система для порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей (Basic Local Alignment Search Tool)
Bootstrap	– метод бутстреп-аналізу — вирівнювання сиквенсів
CDC	– центр контролю за хворобами (Center for Disease Control)
GISAID	– глобальна ініціатива поширення всіх даних по грипу
НА	– гемаглютинін
MDCK	– перещеплювана культура клітин, отримана з нирки собаки кокер-спаніеля
MDCK-SIAT	– генетично модифікована культура клітин MDCK
MEGA6	– програма для побудови філогенетичних дерев
NA	– нейрамінідаза
NJ	– метод об'єднання найближчих сусідів (Neighbor-Joining)
RT-PCR	– полімеразно-ланцюгова реакція в реальному часі

ВСТУП

Незважаючи на значні наукові здобутки останніх десятиліть, грип залишається серйозною проблемою для всього світу та є найбільш розповсюдженою інфекційною хворобою. Щорічні епідемії грипу призводять до значної кількості захворювань та смертності у світі. Віруси грипу типу А здатні викликати пандемію, що призводить до втрати мільйонів життів [1].

Здатність вірусу грипу до антигенної та генетичної мінливості за рахунок різних механізмів – точкових мутацій, рекомбінацій та реасортацій, змушує вчених проводити постійний моніторинг циркуляції вірусів [2]. Високі темпи зміни поколінь вірусів, одночасна циркуляція вірусів грипу людини і тварин визначають швидкість еволюційних процесів. Все це уможливорює формування вірусу з новими антигенними і біологічними властивостями, тобто полегшує адаптацію вірусу до змін у навколишньому середовищі. Мінливість антигенних і біологічних властивостей є фундаментальною особливістю вірусів типу А [3]. Аналіз антигенної мінливості вірусу грипу становить важливу задачу, оскільки саме він дозволяє відслідковувати антигенний дрейф вірусів і вчасно вносити зміни до складу грипозних вакцин [4]. Молекулярні методи дослідження, зокрема генетичний аналіз – метод сиквенування, дозволяють спостерігати за змінами у вірусах грипу на генетичному рівні. Саме генетичний аналіз дозволяє не лише визначити спорідненість вірусів грипу до відомих штамів, а й уможливорює порівняння всіх досліджуваних ізолятів між собою, даючи повну генетичну картину тієї чи іншої популяції вірусів грипу.

Порівняння властивостей нових штамів вірусів з вже охарактеризованими референс-вірусами минулих років дозволяє робити прогнози відносно можливої вірулентності цих збудників, про патогенез інфекції, викликані такими вірусами, а також дозволяє прогнозувати

появу змінених епідемічних та пандемічних штамів [4]. Саме це наразі стало пріоритетним напрямком дослідження вірусів грипу людей на молекулярному рівні.

Вивчення молекулярно-генетичних характеристик штамів вірусів А і В, що циркулюють в Україні, є одним з основних ланцюгів системи моніторингу еволюційних змін вірусів на території нашої країни за певний період.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у межах науково-дослідних робіт, виконаних у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України»: «Філогенетичний аналіз вірусів грипу та напрямок їх еволюції» (№ держреєстрації: 0111U002013) - 2011-2013 роках та «Розробити програму етіологічного прогнозування епідемій грипу в Україні» (№ держреєстрації: 0114U000383) - 2014-2016 роках.

Мета та завдання дослідження. Аналіз мінливості вірусів грипу за антигенними і генетичними характеристиками та на основі філогенетичного порівняння (з 2012 по 2015 роки).

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- 1) Виділити та накопичити в культурі клітин віруси грипу в епідемічних сезонах 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015 років.
- 2) Встановити антигенну подібність виділених вірусів грипу до референс-штамів, визначених Світовими центрами грипу.
- 3) Проаналізувати генетичне різноманіття вірусів грипу, ізольованих в Україні з 2012 по 2015 роки.
- 4) Провести посезонний філогенетичний аналіз вірусів грипу, циркулюючих в Україні, для визначення їх генетичної спорідненості з такими, що циркулюють в світі.
- 5) Проаналізувати наявні мутації у генах HA і NA вірусів грипу, виділених в Україні у 2012-2015 роках за базою даних GISAID.

Об'єкт дослідження — генетична і антигенна мінливість вірусів грипу А та В, що циркулюють в Україні.

Предмет дослідження — віруси грипу типів А і В, антигенні та генетичні характеристики вірусів грипу.

Методи дослідження. Вірусологічні, молекулярно-генетичні, філогенетичні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше на основі побудови унікальних філогенетичних дерев з використанням методу об'єднання найближчих сусідів (NJ) встановлена генетична подібність досліджуваних ізолятів 2012-2015 років до вірусів грипу, виділених в інших країнах в цей час та до вакцинних штамів.

Вперше проведено антигенний аналіз актуальних вірусів грипу людей, що циркулювали в країні у 2012-2015 роках, та визначено їх ступінь подібності до референс - та вакцинних штамів.

Вперше на основі аналізу амінокислотних послідовностей генів HA і NA вірусів грипу 2012-2015 років, виявлені унікальні амінокислотні заміщення, притаманні лише вірусам грипу, що циркулювали в Україні та виявлені мутації, які відрізняли ці віруси від таких, що циркулювали в світі.

Вперше в Україні проведений посезонний **порівняльний** аналіз амінокислотних заміщень вірусів грипу людей типу А: А(Н3N2), А(Н1N1)pdm09 та типу В генетичної гілки — В/Yamagata, що циркулювали в Україні та в інших країнах в цей період, що дозволило виявити різноманіття циркулюючих збудників грипу, які належали до різних генетичних кластерів протягом періоду спостереження.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані результати впроваджено у роботу Національного Центру грипу в Україні, який є важливою складовою ланкою нагляду за грипом у світі. Філогенетичний аналіз був застосований для вдосконалення дослідження генетичної мінливості збудників грипу в країні, що допомогло проводити етіологічне прогнозування епідемій грипу в країні, а саме – появу нових епідемічних штамів та визначення домінуючого збудника кожної епідемії на рівні штаму та генетичної групи.

Результати роботи щороку використовувались Національним центром грипу для укладання епіологічного прогнозу наступної епідемії та впроваджувались в роботу МОЗ та ДСЕС України для прийняття управлінських рішень.

Генетичний аналіз виділених в Україні вірусів був застосований також як інструмент контролю якості роботи вірусологічних лабораторій.

За даними результатами виконаної роботи підготовлено до друку один інформаційний лист для медичних працівників та населення.

З сезону 2014-2015 року застосовується та рекомендується для впровадження у практику ізоляція вірусів грипу на генетично модифікованій культурі клітин MDCK-SIAT замість MDCK, як більш чутлива

модель, а також для запобігання виникнення великої кількості синонімичних мутацій в вірусах при культивуванні.

Направлення українських штамів вірусів грипу до світових центрів грипу (CDC, Атланта, США та Лондон, Великобританія) з наступним їх детальним вивченням і порівнянням зі штамами з інших країн, дало змогу враховувати одержану інформацію при відборі штамів вірусу грипу для формування рекомендацій щодо складу вакцин до кожного наступного епідемічного сезону.

Результати роботи були впроваджені у педагогічний процес на кафедрі вірусології НМАПО ім. П.Л.Шупика.

Особистий внесок здобувача.

Дисертація є самостійною роботою автора. Ідея роботи, мета і завдання досліджень сформульовано автором особисто. Опрацювання літературних джерел, інформаційний пошук, розробка схеми експерименту та її реалізація, отримання експериментальних даних, їх узагальнення та інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом д.мед.н. А.П. Міроненко.

Лабораторні дослідження первинних зразків методом real-time RT-PCR, виділення вірусів грипу на культурі клітин MDCK та MDCK-SIAT, проведення штамової ідентифікації виділених ізолятів вірусів грипу проводились у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» разом з науковими співробітниками відділу.

Філогенетичний та антигенний аналіз вірусів грипу A(H3N2), A(H1N1pdm)09, B/Yamagata, виділених в Україні з 2012 по 2015 роки проведений автором особисто у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» .

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на науково – практичній конференції «Інфекційні хвороби: невирішені проблеми (діагностика, етіопатогенетичні особливості, лікування, профілактика)» (Київ, 2013); VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва , 2014); 4th International Influenza Meeting (Muenster, September 21-23, 2014); конференції в рамках VI Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (Київ, 2015); науково-практичній конференції «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна

безпека», присвяченої щорічним «Читанням» пам'яті академіка Л.В.Громашевського (Київ, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, з них 11 наукових статей у фахових наукових виданнях (4 мають індекс цитування), 2 – у закордонному виданні та 9 тез наукових конференцій (4 – за кордоном).

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

1.1. Характеристика вірусів грипу людей

1.1.1. Структура віріону та особливості вірусів грипу

Вперше вірус грипу людини був виділений в 1933 році групою англійських вчених: В.Смітом, К. Ендрюсом та Лейд-Лоу під час епідемії хвороби в Англії [5]. В 1940 році Т. Франсис і Т. Меджил та в 1947 році Р.Тейлор виділили нові варіанти вірусу грипу, то, з урахуванням порядку та часу виділення, їх позначили першими буквами латинського алфавіту як віруси грипу типу В та С [5].

Таксономічно віруси грипу відносять до родини *Orthomyxoviridae*, яка налічує 5 родів: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Isavirus* та *Thogotovirus*. Представники родів *Influenzavirus A*, *B*, *C* є вірусами грипу, антигени яких не дають перехресних серологічних реакцій [3]. Рід *Isavirus* включає єдиного представника — вірус інфекційної анемії лосося. Представники роду *Thogotovirus* – віруси дорі (*dho*) та тогото (*thogoto*), передаються за допомогою кліщів та уражують хребетних (зрідка людей) [6].

Віріон правильної сферичної або плеоморфної форми, діаметром 90-120 нм, складається з суперкапсиду, капсиду, геному і трьох поліпептидних білків. Зустрічаються нитчасті форми довжиною у кілька мікрометрів та дефектні ниткоподібні форми, які не містять нуклеїнової кислоти [7].

Віріони вкриті суперкапсидною оболонкою, яка представлена біліпідним шаром клітинного походження з інкрустованими глікопротеїнами та неглікозильованими білками [3]. На поверхні віріону є шипи діаметром 4-6 нм та довжиною 10-14 нм, що за природою є глікопротеїнами [7]. Капсид складається із білку нуклеопротеїну (NP), а

також білків полімеразного комплексу (Р). Нуклеокапсид оточений матриксним та мембранним білками [6].

Вірусний геном представлений лінійною одноланцюговою сегментованою мінус РНК. Залежно від роду, віріони містять різну кількість сегментів РНК: *Influenzavirus A* та *Influenzavirus B* – 8 сегментів, *Influenzavirus C* – 7 сегментів.

У віріоні вірусу грипу типу А в ліпідну мембрану вбудовані тример НА й тетрамер NA. Кількість молекул НА у структурі віріону переважає [8]. Нині відомо 18 підтипів гемаглютиніна (НА) та 11 підтипів нейрамінідази (NA) вірусів грипу А, що циркулюють серед хребетних [9]. Оболонка також містить невелику кількість білка М2, що формує іонні канали. Внутрішнім компонентом є М1-матриксний білок і вірусний рибонуклеопротейн, що складається із сегментів РНК, асоційованих із білком нуклеокапсиду NP і полімеразними білками – PA, PB1, PB2 [8].

Ліпіди у ліпідній оболонці складають близько 18-37% маси віріону. Вони походять з плазматичної мембрани клітини-хазяїна.

Вуглеводи у складі глікопротеїнів та гліколіпідів становлять 5% маси віріону. Їх склад залежить від клітини-хазяїна та вірусу.

Гемаглютинін вірусу грипу являє собою поверхневий глікопротеїн. НА є основним специфічним антигеном вірусу, який разом з нейрамінідазою визначає підтип вірусу та викликає утворення протективних антитіл [8]. Він відповідає за здатність вірусу грипу зв'язуватись з клітинними рецепторами хазяїна та проникати в клітину [10].

Нейрамінідаза є головним поверхневим глікопротеїном вірусів грипу, який розщеплює зв'язок між сіаловою кислотою (N-ацетилнейраміною) та сусідніми залишками цукру [11].

Активність нейрамінідази необхідна під час початкового утворення вірусних частинок з поверхні інфікованої клітини, для попередження їх агрегації. Крім того, нейрамінідаза розщеплює нейрамінові залишки

муцину, що знаходиться в дихальних шляхах, тим самим полегшуючи рух вірусних часток в клітини-мішені [12].

Матриксний білок (M1 чи M) — мультифункціональний неглікозильований білок, що розміщений під суперкапсидною оболонкою та бере участь в формуванні капсиду вірусів грипу [13]. Він складає 30-50% загального вірусного білка, число копій не перевищує 800 на вірусну частку. В складі віріону він розташований прямо під вірусною ліпопротеїновою оболонкою в формі димерів і знаходиться у взаємодії з вірусним рибонуклеопротеїновим комплексом. Ця здатність є важливою при проникненні вірусу в клітину та збірці вірусних часток. M1 білок оточує вірусний рибонуклопротеїд [14].

Мембранний білок (M2) у вірусів грипу А - це інтегральний мембранний білок, що складається з 97 амінокислот, формує протонний канал, що функціонує протягом вірусного проникнення, сприяючи окисленню вмісту віріонів у ендосомах [15]. На пізній стадії інфекції M2 допомагає регулювати рН під час транспортування вірусних компонентів через апарат Гольджі [16].

Внутрішні білки вірусів грипу теж піддаються мінливості, яка впливає на репродукцію вірусів у організмі хазяїна.

Структурні білки є спільними для родів *Influenza virus A* та *Influenza virus B*.

Білок NB вірусів грипу типу В [17] має ряд схожих ознак з M2, зокрема, він є малим інтегральним білком, який містить 100 амінокислотних залишків з коротким N-кінцевим доменом. Але, на відміну від M2, NB білок вірусів грипу В закодований з нейрамінідазою (NA) і транслюється з першого ініціюючого кодону мРНК [18]. Подібно M2, білок NB функціонує як протонний канал протягом ендоцитозу.

Полімеразні протеїни (PB1, PB2, PA) формують вірусну полімеразу (реплікативний комплекс) і залучені у транскрипцію та реплікацію вірусного геному [19]. PB1 сегмент, — це РНК-залежна РНК-полімераза,

яка відповідає за елонгацію РНК ланцюга [20]. PB2 утворює комплекс рибонуклеопротеїду (RNP) з вісьмома сегментами геному і переміщує його в ядро. В ядрі PB2 зв'язується з кепованими клітинними мРНК. У свою чергу PA (ендонуклеаза) відрізає олігонуклеотиди кепу від клітинних РНК, що дозволяє полімеразі приєднати їх до вірусних мРНК [4].

Білок нуклеокапсиду (NP) зв'язує одноланцюгові РНК вірусів грипу з вірусними ферментами PB1 та PB2 з подальшим утворенням RNP комплексу для енкапсидації [21]. NP також взаємодіє з клітинними поліпептидами, включаючи актин, компоненти ядерного імпорту та експорту та з ядерними РНК хеліказами, беручи участь у транскрипції, реплікації та внутрішньоклітинному транспорті вірусного геному [22].

До неструктурних білків вірусів грипу відносять NS1 та NS2. NS2 - білок ядерного транспорту. NS1 - мультифункціональний білок, що бере участь у білково-білкових та білково-нуклеотидних взаємодіях, неспецифічно зв'язуючи дволанцюгову РНК та специфічні білкові фактори [23]. Їх N-кінцевий структурний домен (РНК-зв'язуючий) визначає резистентність вірусу до інтерферону через блокування РНК-ази L та пригнічення активації протеїнкінази R шляхом ізолювання дволанцюгових РНК. С-кінцевий (ефекторний) домен пригнічує дозрівання та ядерний транспорт клітинних полі(А)-вмісних мРНК шляхом їх зв'язування і нарізання [24,25].

Віруси грипу широко розповсюджені в природі і уражають як людей, так і ссавців і птахів. Віруси грипу А уражають свиней, птахів, коней, тюленів та верблюдів. Описані також випадки інфікування китоподібних та кажанів. Дикі водоплавні птахи є головним природним резервуаром вірусів грипу А, їх головною еволюційною нішею [26]. У них віруси грипу викликають інфекцію кишкового тракту без видимих клінічних проявів. Віруси грипу А водоплавних птахів можуть передаватися домашнім птахам (наприклад, під час використання одних і тих же водоймищ), викликаючи спорадичні випадки захворюваності [27]. Птахи інфікуються

орально, а віруси грипу передаються у них фекально-оральним шляхом. Завдяки сезонним міграціям птахів, віруси грипу ефективно поширюються по всьому світі. Віруси грипу птахів використовують рецептори клітин травного тракту із залишками сіалової кислоти α -(2,3), в яких вони здатні реплікуватися. Більшість вірусів грипу А птахів є непатогенними для людей, проте вони належать до зоонозних інфекцій та здатні до стабільної адаптації в людській популяції і тривалої передачі від людини до людини поряд з ВІЛ і SARS [28]. На сьогодні відомі лише три підтипи вірусів грипу А здатні інфікувати людину: А(Н1N1), А(Н2N2), А(Н3N2) [29]. Віруси грипу В вражають людей і морських котиків [30]. Вірус грипу С виділяється тільки у людей, зокрема – дітей, і здатен викликати лише незначні спалахи інфекційного захворювання [31].

Усі охарактеризовані на сьогоднішній день пандемії були викликані вірусами грипу птахів або свиней, які потрапили в людську популяцію, в якій відсутній імунітет до таких підтипів збудника [32]. (рис.1.1.).

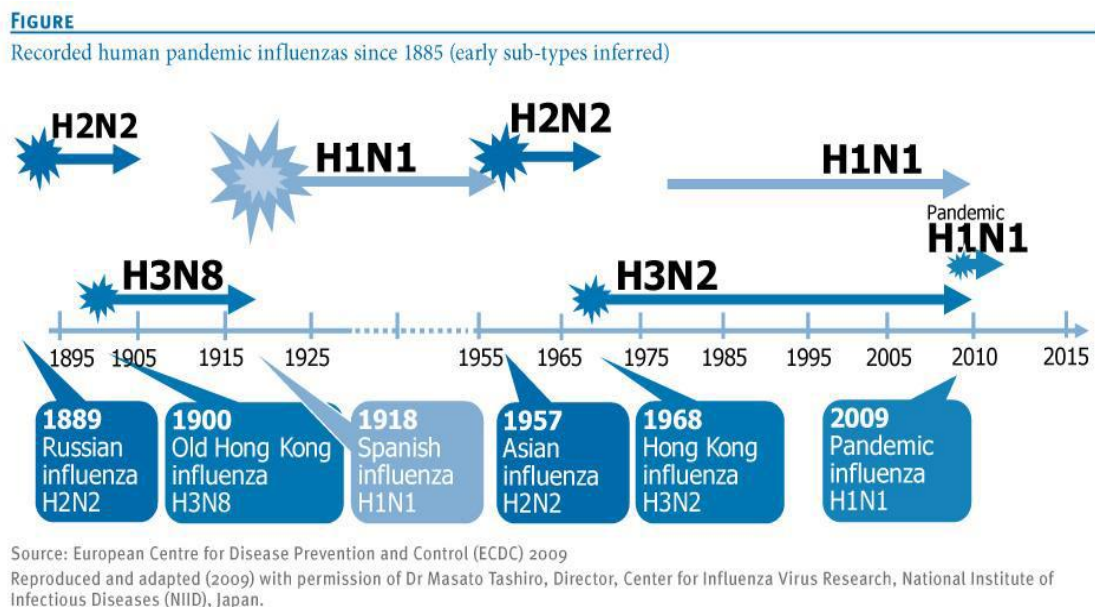


Рис.1.1. Часова шкала з нанесеними пандемічними подіями і етіологічними агентами пандемій [32]

Занесення нових варіантів генів вірусів грипу в людську популяцію відбувається шляхом інтродукції генів пташиних вірусів шляхом рекомбінації, найчастіше в організмі свиней [33]. Експерименти

інфікування показали, що свині є високо сприйнятливими до вірусів грипу птахів усіх субтипів, оскільки епітеліальні клітини респіраторного тракту свиней мають рецептори до людських і пташиних вірусів одночасно [34].

Висока мінливість вірусів грипу дає підставу стверджувати, що реасортація генів між окремими варіантами вірусу А постійно відбувається в природі. Незважаючи на те, що більшість підтипів вірусу грипу А знайдено у птахів, все ж їх участь у виникненні нових підтипів вірусу грипу людини не доведено [35].

Постійна мінливість вірусів грипу А зумовлена змінами у послідовностях їх генів під тиском еволюційного добору. Зміни олігонуклеотидних послідовностей у генах епідемічних вірусів грипу у міжпандемічний період відбуваються за рахунок мутацій. Накопичення мутацій у генах призводить до змін антигенних властивостей вірусів [36,37]. Результати генетичних досліджень, проведені на основі секвенування геному вірусів грипу, дозволили встановити визначальну роль мутаційних перетворень у геномі вірусу для виникнення нових епідемічних штамів [38].

Сегментованість геному вірусу грипу сприяє можливості реасортації вірусних геномів в випадку одночасного зараження людини чи тварини різними вірусами грипу. У процесі реасортації ген НА вірусу грипу (рідше NA) може бути заміщеним відповідним геном, що кодує цей білок у іншого підтипу

Найбільш складним прикладом реасортації генетичних сегментів вірусів грипу при формуванні пандемічних штамів безумовно можна вважати вірус грипу А (H1N1)pdm09, що спричинив пандемію 2009 – 2010 рр. і широко розповсюдився в світі в 2009 році. Новий пандемічний штам виявився потрійним рекомбінантом вірусів грипу людей, свиней і птахів (рис. 1.2.) [39].

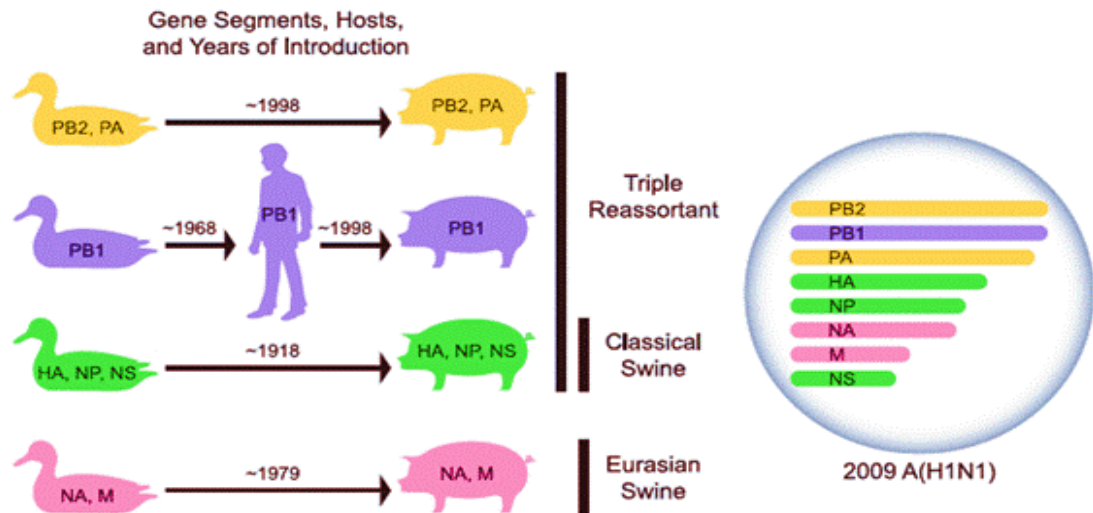


Рис.1.2. Походження сегментів геному вірусів пандемічного грипу А 2009 р. [39]

Будучи зоонозним штамом за своїм походженням, А(H1N1)pdm09 від людей повернувся в популяцію свиней, де закріпився і активно циркулює по цей час [40]. Більш того, відмічають чисельні випадки передачі цього вірусу індикам, домашнім тваринам (котам, собакам, тхорам), але не качкам та курям [41].

1.1.2. Репродукція вірусу грипу в організмі хазяїна

Процес репродукції вірусів грипу в сприйнятливій клітині можна умовно поділити на три етапи. На першому етапі відбувається адсорбція віріону на чутливій клітині, проникнення його в клітину і «роздягання» вірусної частки до рибонуклеопротеїду. На другому етапі здійснюються транскрипція, реплікація РНК, трансляція і на третьому кінцевому етапі, що отримав назву «дозрівання», відбувається складання нових віріонів, які виходять з клітини шляхом брунькування.

Ранні стадії репродукції (транскрипція) відбуваються в ядрі інфікованих клітин, пізні — в цитоплазмі. Дозрівають віріони на плазматичних мембранах [42].

Чутливими до вірусу грипу є циліндричні та бокаловидні клітини в'їчастої епітелії верхніх дихальних шляхів людини, птахів та деяких ссавців. За допомогою своїх рецепторних сайтів прикріплення, які у неактивному стані заглиблені у «рецепторні кишені», функцію поверхневого рецептора виконує гемаглютинін (НА) [43].

До чутливих клітин проникнення вірусу грипу здійснюється шляхом рецептор-опосередкованого ендоцитозу. Гемаглютинін вірусів грипу людей зв'язується з клітинними рецепторами, у яких кінцева сіалова кислота поєднана з галактозою 2'-6' зв'язком [7]. Відбувається утворення ендосоми та зниження рН, внаслідок чого зливаються вірусна та клітинна мембрани. Інфекційність та здатність злиття залежить від пост-трансляційного нарізання попередника гемаглютиніну на НА₁ та НА₂. Фрагмент НА₂ виконує функцію білку злиття, «розтягуючи» поверхневу оболонку віріону. Тому разом з проникненням здійснюється наступний етап репродукції вірусу — роздягання до нуклеокапсиду, покритого шаром матричного білку [22].

Оскільки геном вірусу грипу представлений РНК негативної полярності, він має власну транскриптазу (білок РВ1 в складі нуклеокапсиду). Проте, у нього вона не здатна ініціювати синтез мРНК та модифікувати 5'-кінець РНК-транскрипту метильованими «кепами». В цих умовах вірус не може обійтись без допомоги клітинних транскриптаз, і, насамперед, без синтезованих клітиною «кепів». Саме тому, транскрипція вірусного геному починається з «крадіжки»: вірусоспецифічна ендонуклеаза (білок РВ2) здійснює гідроліз клітинної мРНК, забираючи її «кеп» та ще 10-13 нуклеотидів з гідроксильною групою на 3'-кінці. «Вкрадений» олігонуклеотид виконує функцію затравки для подальшої елонгації транскрипції вже вірусною транскриптазою, яка після термінації синтезу модифікує 3'-кінець, приєднуючи до нього поліаденілову послідовність. При транскрипції генів вірусів грипу відбувається сплайсинг та зсув рамки зчитування мРНК [14,22].

Трансляція вірусних білків відбувається в цитоплазмі клітини-хазяїна. Спочатку синтезуються ранні білки – це NP-, NS- та Р-протеїни, за ними – матриксний білок та, в останню чергу, поверхневі глікопротеїни.

Брунькування через мембрану клітини зумовлює набуття двошарової ліпідної оболонки та формуванням зрілих вірусних часток [44]. Повний цикл репродукції вірусу грипу становить 6-8 годин, а вихід віріонів складає - 10^3 – 10^4 віріонів на клітину [7].

Наявність інформації про структуру та цикл репродукції вірусів грипу розкриває багато аспектів їх інфекційності, як збудників.

1. 2. Антигенна та генетична характеристика вірусів грипу

1.2.1. Антигени вірусів грипу людей

Віруси грипу мають внутрішні та поверхневі антигени. Внутрішні антигени представлені нуклеопротеїном (NP-білком) і М-білками. Це типоспецифічні антигени, антитіла до яких не захищають від захворювання на грип. Поверхневі антигени – це гемаглютинін та нейрамінідаза, вони є протективними білками, оскільки дія віруснейтралізуючих антитіл направлена саме на них [45].

Гемаглютинін (НА) — є основним штамоспецифічним поверхневим антигеном. Він виконує роль розпізнавання клітинних рецепторів і індукцію нейтралізуючих антитіл. Мінливість гемагглютинуючого антигену сприяє появі нових епідемій грипу. Цей глікопротеїн забезпечує розпізнавання залишків сіалової кислоти (рецепторів), прикріплення вірусу до клітини з подальшим проникненням до чутливих клітин шляхом рецепторного ендоцитозу [46].

За біохімічною структурою гемаглютинін — мембранний глікопротеїн першого типу з N-кінцевою сигнальною послідовністю, трансмембранним

якірним доменом та коротким цитоплазматичним хвостом [4]. НА синтезується у вигляді білка-попередника, який підлягає подальшій протеолітичній посттрансляційній модифікації шляхом додавання N-зв'язаних вуглеводів до семи залишків аспарагіну на кожному мономері [47].

Субодиниця НА являє собою тример. В будові гемаглютиніну визначають дві структурні ділянки — стеблину та глобулу. Залишки субодиниці NA_2 складають основу стеблини молекули. Мембранно-дистальна «голова» молекули являє собою глобулярний домен, багатий на β -структури і повністю складається із залишків NA_1 субодиниці. В складі глобули розрізняють рецептор-зв'язуючий сайт («кишеню») на кінці кожного мономера і ділянку, що розпізнається нейтралізуючими антитілами. Рецептор-зв'язуючий сайт містить консервативні амінокислотні залишки [48].

Структура поверхневих антигенів для вірусів грипу типу А постійно змінюється. Тип В більш стабільний, хоч і має 5 підтипів. Найбільш стабільну антигенну структуру має вірус грипу типу С [45].

За генетичними та антигенними властивостями розрізняють 18 субтипів гемаглютиніну (H1 – H18): три з яких (H1, H2, H3) зустрічаються серед людей, два (H3, H7) циркулюють у коней, два (H1 і H3) поширені серед свиней, останній з відкритих субтипів був виявлений у рослиноїдних крилатих мишей в Центральній Америці [9]. Всі 18 зустрічаються у численних популяціях птахів [4]. Також, філогенетично вирізняють дві групи гемаглютининів: перша група включає субтипи H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 та H18; до другої групи належать H3, H4, H7, H10, H14 та H15 (рис. 1.3) [46].

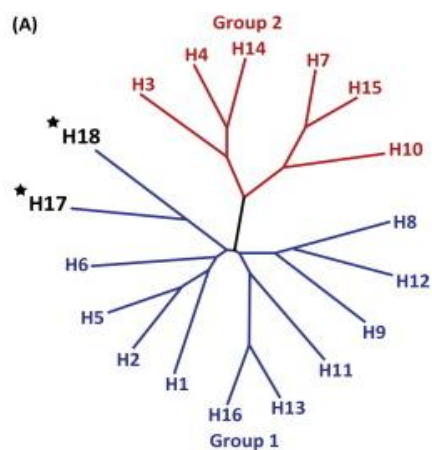


Рис. 1.3. Філогенетична організація субтипів гемаглютининів [46]

Нейрамінідаза (NA) — фермент, другий вірусоспецифічний поверхневий антиген вірусу грипу. Амінокислотна послідовність NA кодується 6 сегментом РНК.

Нейрамінідаза є поверхневим глікопротеїном вірусів грипу типів А та В з молекулярною масою 240 kDa, який каталізує розривання N-ацетилнейрамінової (сіалової) кислоти — цукристого залишку на кінці глікосахаридів. Розривання сіалової кислоти призводить до відщеплення вірусу від субстрату, який таку кислоту містить, в тому числі від рецепторів епітеліальних клітин, що в подальшому призводить до руйнування рецептору (тому інша назва нейрамінідази— рецептор-руйнуючий ензим) [48]. Ще однією важливою функцією NA є відокремлення вірусних часток, які вийшли з клітини у міжклітинний простір, від неспецифічних інгібіторів — мукополісахаридів, що містяться в дихальних шляхах [4].

На поверхні віріону NA є тетрамером грибоподібної («mushroom-shaped») форми [49]. Одна вірусна частка містить близько 50 тетрамерів NA. Тетрамери здатні формувати кластери на поверхні віріону [5]. Субодиниці, що формують шапку гриба, побудовані з 6-пластинчатих гвинто-подібних структур, пластини яких сформовані з чотирьох антипаралельних β -структур. Активний сайт ензиму, розміщений в центрі кожної з чотирьох субодиниць [46,48].

На сьогодні відомо 11 субтипів нейрамінідази вірусу грипу А (N1-N11) [9]. Субтипи N1 і N2 зустрічається у вірусів людини і у вірусів свиней, N7 і N8 - у вірусів коней, N10 і N11 - у фруктоїдних кажанів, і всі 11 NA — у вірусів грипу птахів [50]. При філогенетичному порівнянні генів нейрамінідази вірусів грипу типів А і В, вони розподіляються на чотири відмінні групи (рис. 1.4). До першої входять N1, N4, N5 та N8, до другої — N2, N3, N6, N7 та N9, недавно виявлені N10 та N11 виокремлюють в третю групу та нейрамінідаза грипу В знаходиться окремо.

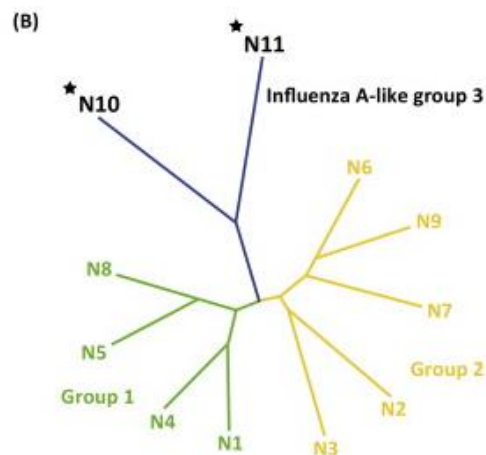


Рис. 1.4. Філогенетична організація субтипів нейрамінідази [50]

Заміни відбуваються в поверхневих антигенах вірусу – гемаглютиніні та нейрамінідазі, що призводять до зміни інфекційних властивостей вірусів грипу. Найімовірніше, такий еволюційний механізм пристосування вірусу забезпечує його виживання. Нові штами вірусів, на відміну від своїх попередників, не зв'язуються специфічними антитілами, які накопичуються в людській популяції.

Існує два механізми антигенної мінливості: відносно невеликі зміни (антигенний дрейф) і сильні зміни (антигенний шифт).

Антигенний дрейф – характерний як для вірусів грипу А, так і для вірусів грипу В, але значно меншою мірою. Антигенні (дрейфові) варіанти вірусів грипу А з'являються і домінують протягом 2-8 років, а потім заміщуються наступним антигенним різновидом [51]. Антигенний дрейф

відбувається в результаті точкових мутацій в геномі, що, в свою чергу, приводить до зміни антигенних детермінант білків до того моменту, що вони перестають розпізнаватись імунною системою хазяїна. Саме мутації, що включають заміни, делеції та інсерції, відповідають за виникнення нових антигенних варіантів [2]. Постійні зміни областей HA та, в меншій мірі NA, які впізнаються антитілами, допомагають вірусу грипу уникати імунної відповіді хазяїна [52]. Перевага у кожному наступному епідемічному сезоні набуває той варіант вірусу, який своєчасно поновив свої поверхневі білки.

Інтенсивність антигенного дрейфу вірусів частково можна прослідкувати за зміною штамів, що входять до складу грипозних вакцин [2].

Другий вид антигенної мінливості – антигенний шифт, був описаний для вірусів грипу А та В [53]. У випадку змішаної інфекції, коли в одній клітині розмножуються два різних штами вірусу грипу А, в тому числі і віруси грипу тварин і птахів, до яких популяція не має імунітету, можлива реасортація сегментів геному, що призводить до утворення принципово нових варіантів збудника [54]. Через нерегулярні проміжки часу (10-40 років) з'являються віруси з значними відмінностями від основної популяції. Шифт фактично є рекомбінацією геномів двох різних вірусів грипу в одній клітині [55]. Процесу рекомбінації сприяє сегментованість геному вірусів грипу, що дає можливість при одночасній репродукції двох вірусів в одній клітині перегрупуватись сегментам батьківських геномів при збиранні дочірніх віріонів. У випадку, якщо в одному організмі (наприклад, свині) зустрічаються два різних віруси грипу, то вони можуть обмінюватися гомологічними фрагментами нуклеїнової кислоти один з одним. Найчастіше замінюються 4-й (HA) та 6-й (NA) сегменти РНК геному вірусів грипу. Проте невелика кількість комбінацій генів призводить до виникнення збудників з геномом, який може ефективно проникати та репродукуватись в людському організмі [7]. У результаті

антигенного шифту утворюються абсолютно нові штами вірусів, проти яких переважна більшість населення не має імунітету. Такі непередбачувані зміни до сьогодення спостерігалися тільки у вірусів типу А. У результаті розвиваються пандемії у всіх вікових групах, які тим важче, чим сильніше змінився вірус [56].

1.2.2. Генетична характеристика вірусів грипу на сучасному етапі

У вірусів грипу типів А та В геном складається з восьми сегментів лінійної одноланцюгової рибонуклеїнової кислоти (РНК) негативної полярності, які кодують 10-12 вірусних білків (залежно від роду) з молекулярною масою від 14×10^3 до 76×10^3 Да [5]. Такий тип геному надає йому змогу реасортуватись в процесі змішаної інфекції і має велике значення у мінливості вірусів грипу [57]. Однак, між вірусами грипу різних типів не були виявлені рекомбінації [55]. Геном кодує 10 білків. 6 найбільших сегментів геному кодує по 1 білку, в той час як менші сегменти (7, 8) кодують додаткові білки за рахунок сплайсингу чи біцистронних мРНК [5].

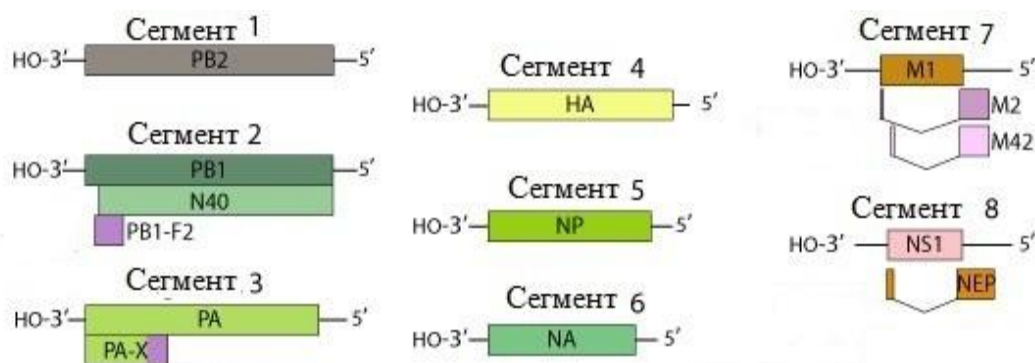


Рис. 1. 5. Геном вірусу грипу типу А [5]

П'ять найбільших сегментів геному кодують по одному білку кожний за моноцистронною схемою, за винятком PB1 гену, який у більшості штамів кодує білки PB1 і PB1-F2. Багато штамів кодують також

поліпептид N40, який транслюється з тієї ж відкритої рамки зчитування, що й PB1, але його ініціація відбувається з другого AUG кодону. Три сегменти меншого розміру кодують по кілька білків кожен, де додаткові білки утворюються внаслідок сплайсингу або утворення біцистронної РНК. Три найбільші сегменти РНК кодують Р-білки (білки полімеразно-транскрипційного комплексу - PA, PB1, PB2). Четвертий сегмент кодує вірусний гемаглютинін (HA), який синтезується як єдиний поліпептидний ланцюг та подалі піддається процесингу, а 5-й — нуклеокапсидний протеїн (NP). Шостий сегмент кодує нейрамінідазу (NA) і NB. Сьомий сегмент кодує два високо консервативні білки: у вірусів грипу А — M1 і M2, а у вірусів грипу В — M1 і BM2. У вірусів грипу С аналог білку M2 називається CM2. Восьмий сегмент, найкоротший у вірусів грипу А, кодує також два білки: NS1 та NS2 (NEP) [7,14].

Віруси грипу А та В дуже подібні за будовою, однак у них є важливі відмінності. Головною відмінністю є будова мембранних каналів: у грипу А цю функцію виконує M2 білок, який кодується сьомим сегментом шляхом сплайсингу мРНК [58]; а у грипу В - це білок NB, що кодується шостим сегментом (також кодує NA) [59]. Також ці 2 типи вірусів грипу відмінні за розміром їх геномів, проте така відмінність не спостерігається у розмірах білків. РНК вірусів грипу В мають довші некодуючі послідовності, які, вважають, можуть містити типоспецифічні сигнали для запаковки у новосформовані віріони [7].

1.2.3. Дослідження мутацій в генах вірусів грипу та їх вплив на інфекційний процес

Віруси грипу мають високий рівень мутацій: від 1×10^{-3} до 8×10^{-3} замін на сайт за рік [60], що викликано помилками у роботі вірусної полімерази. Мінливість вірусів грипу виражається у формі антигенного шифту та

дрейфу, утворенні делеційних мутантів або дефектних інтерферуючих часток (ДІЧ), гетерозиготності чи фенотипового змішування.

Ускладнення та перебіг грипозного захворювання часто асоціюють з точковими мутаціями, що виникають в основному в генах поверхневих білків: гемаглютиніну та нейрамінідази, що призводить до зміни властивостей вірусів [61].

Пандемічні віруси грипу A(H1N1)pdm09 найкраще досліджені на наявність мутацій в гені гемаглютиніну (HA) в положенні 222: D222G і D222E. Такі мутації були знайдені у вірусів, що викликали тяжкі та випадки середньої тяжкості захворювання на пандемічний грип (H1N1), щонайменше в 20 країнах [62]. З даною мутацією асоціюють ряд ускладнень, таких як: легенева кровотеча, тяжкість інших симптомів та високу смертність [63].

Загалом інфекція грипу у ссавців обмежується верхнім дихальним трактом, де переважають рецептори сілової кислоти $\alpha 2$ -6. Припускають, що заміна D222G призводить до змін рецепторної специфічності вірусів грипу A(H1N1)pdm09. Це дає можливість впливати на зв'язування $\alpha 2$ -3-сілових рецепторів, не втрачаючи при цьому спорідненості і до $\alpha 2$ -6-сілових рецепторів, тобто вірусний HA може зв'язуватися з обома залишками сілової кислоти. Клітини респіраторного тракту експресують $\alpha 2$ -3 рецептори в нижніх відділах дихальної системи. Це формує гіпотезу, що дана заміна дозволяє вірусу інфікувати не лише верхні дихальні шляхи, а й більш глибокі відділи респіраторного тракту, що спричинює тяжкий перебіг захворювання і, можливо, загибель хворого [62]. Також було встановлено, що ізоляти, виділені від хворих з тяжкими формами і з секційного матеріалу, мають мутацію D222G частіше, ніж вона зустрічається серед клінічних зразків, отриманих від хворих з легкою чи середньою формою тяжкості грипу [64].

Окрім варіабельності в положенні 222, була також відмічена заміна Q223R. Роль цієї мутації до кінця не встановлена, ймовірно, її виникнення

пов'язано з системою виділення вірусу. За даними центру ВОЗ в Лондоні відомо, що Q223R пов'язана з адаптацією вірусів A(H1N1)pdm09 та забезпечує необхідний баланс для оптимального росту вірусів на курячих ембріонах [64].

У штамів вірусів грипу A(H3N2) спостерігалися зміни антигенного сайту А в позиції 145 (K145N). Було показано, що мутація K145N пов'язана зі зміною заряду з зарядженої на незаряджену амінокислотну R-групу. Ця зміна могла вплинути на білково-білкові взаємодії, так як заміна знаходиться всередині сайту глікозилювання та на активність глікозилтрансферази, що в подальшому впливає на зв'язування антитіл з антигенними сайтами [2].

Крім того, у штамів вірусу грипу A(H3N2) в субмолекулі HA1 була знайдена заміна V226I. Було виявлено, що залишок 226 є ключовою амінокислотою в детермінації рецепторної специфічності і зміна Val-226→Ile пов'язана зі зниженням рецептор-зв'язуючої спорідненості вірусів грипу A(H3N2). Інша група вірусів містила амінокислотну заміну N126D, яка була пов'язана з втратою потенційного сайту глікозилювання [65].

Цікавий аналіз більш пізньої мутації E374K, у ізолятів A(H1N1)pdm09, що знаходиться в HA2 субодиниці HA. За даними авторів [66], ця заміна призводить до дестабілізації молекули HA, що збільшує рН середовища, необхідного для її активації. Такі характеристики пов'язані з підвищеною вірулентністю вірусів грипу птахів [2]. В зв'язку з цим припускають, що віруси, які мають заміну E374K, набувають посилену здатність інфікувати клітини-мішені. Проте, експериментального підтвердження цій гіпотезі поки що немає.

Для HA вірусів грипу типу В характерні заміни, що впливали на антигенну ділянку – петля 120 – в двох позиціях 123 та 129 [67]. В період 2012-2013 років у вірусів грипу В генетичної гілки Yamagata була знайдена заміна в позиції 196 в петлі 190 – D196N, яка була пов'язана з набуттям потенційного сайту глікозилювання.

Антигенні властивості та мінливість NA вивчені гірше, ніж HA. Тому більшість амінокислотних мутацій, зареєстрованих в NA пов'язані з змінами в активному сайті фермента та стійкістю до противірусних препаратів.

Для блокування репродукції вірусу в чутливій клітині використовують активний сайт нейрамінідази, як мішень антивірусних хіміотерапевтичних препаратів занамівір, озельтамівір та перамівір, які діють проти обох типів нейрамінідази N1 та N2 та проти нейрамінідази вірусів грипу В [68,69].

Для вірусів A(H1N1)pdm09 (після їх появи в 2009 році) була зафіксована мутація H275Y, яка зумовлювала стійкість до озельтамівіру.

У вірусів грипу типу В знаходять заміну R152K в активному сайті NA, яка відповідає за резистентність як до занамівіру, так і до озелтамівіру. Також було виділено штам, який був стійкий до озелтамівіру і мав заміну D198N в активному центрі NA [2].

Мутації в геномі вірусів викликали їх резистентність до інгібіторів протонної активності M2 білку. Противірусний ефект інгібіторів — амантадину та ремантадину реалізується шляхом блокування іонних каналів в суперкапсиді вірусу [70]. Амінокислотна заміна в положенні 27 (V27A) є головною мутацією, що відповідає за стійкість до амантадину. Ця мутація виявляється практично у 100% випадків у штамів вірусу грипу А (H3N2), виділених від людей в останні декілька років [71].

Постійне спостереження за виникненням та поширенням резистентних штамів вірусів грипу до тих чи інших хіміопрепаратів є надзвичайно важливим завданням, оскільки ці дані враховують при розробці стратегій лікування та профілактики захворювань, спричинених епідемічними та пандемічними штамми вірусів грипу.

РОЗДІЛ 2. Методи дослідження вірусів грипу

Кількість методів, що застосовуються для діагностики вірусних інфекцій, безперервно збільшується. Деякі залишаються в минулому і мають лише історичне значення, інші – удосконалюються. Безумовно, що технічний прогрес прискорює появу нових високоспецифічних і високочутливих методів, зручних для клінічного застосування [72]. Усі сучасні методи, які застосовуються в світі, розподіляються на такі, що проводять з практичною метою, а також ті, які використовують в наукових дослідженнях. Успішність лабораторного підтвердження грипу основною мірою залежить від якості зібраних клінічних зразків та їх оперативного збору, а також – від швидкого транспортування зразків до лабораторії, умов транспортування та зберігання до тестування [73].

Проводиться діагностика грипу шляхом виділення та ідентифікації ізолятів вірусів грипу, виявлення антигенів та серологічного дослідження.

Виділення вірусів на у культурі клітин (КК) є золотим стандартом вірусологічної діагностики. Зазвичай віруси грипу виділяють на КК MDCK (нирковий епітелій самки кокер-спанієля), що є не лише чутливою до вірусів грипу, але й зміни моношару цих клітин під дією вірусу можна спостерігати в мікроскоп.

Діагностика грипу шляхом ізоляції вірусу в КК дозволяє напевне визначити штам та, зазвичай, частіше використовується, ніж серологічний діагноз.

Для етіологічного прогнозування епідемічного процесу потрібно діагностувати, які штами збудника циркулюють у даний епідемічний період та найбільш, ймовірно, видозміняться для подальшого інфікування під час наступних епідемій.

2.1. Методи аналізу антигенних властивостей

Серологічні методи є суттєвими в багатьох епідеміологічних та імунологічних дослідженнях та необхідні для оцінки імунної відповіді на вакцинацію [74].

Для серологічної діагностики респіраторних вірусних інфекцій найчастіше застосовують РГГА, МФА, ІХА. У більшості випадків завдяки більш простій методиці виконання проводять реакцію гальмування гемаглютинації [74].

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА) – це один з різновидів серологічних досліджень, що характеризується високою специфічністю. В основі методу покладена комплементарна взаємодія між антигеном (АГ) і антитілом (АТ), утворений комплекс є досить нестійка структура, яка може дисоціювати. Метою застосування РГГА є ідентифікація збудника, визначення штамової та типової приналежності вірусу, визначення титру АТ, встановлення колективного імунітету [7].

РГГА є найбільш прийнятним методом для типування, субтипуювання та подальшого визначення антигенних характеристик ізолятів вірусу грипу, що здійснюється за використання референс-антисироваток, які містять антитіла до циркулюючих вірусів грипу [72,75-78]. Однак, недоліком цього тесту є обов'язкове усунення дії неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, які, зазвичай, присутні у сироватці. Також необхідно стандартизувати референс- та тест-антигени кожен раз, коли проводиться тестування, і потрібно мати певний досвід у обліку результатів реакції. Тим не менше, РГГА залишається пріоритетним методом визначення антигенних характеристик ізолятів вірусу грипу [79,80].

Перешкодою до використання цієї реакції періодично стає відсутність здатності вірусних ізолятів аглютинувати еритроцити. Віруси змінюються, і змінюється їх здатність зв'язувати еритроцити певних видів тварин або людські.

Імуноферментний аналіз (ІФА) дозволяє виявити імунні комплекси АГ – АТ у носоглоткових змивах хворих. ІФА базується на виявленні антигенів вірусів грипу А та В за допомогою моноклональних антитіл до рибонуклопротеїду відповідних збудників.

Метод флюоресціюючих антитіл (МФА, прямий метод Кунса) є методом швидкої діагностики грипу, який дає змогу отримати результат дослідження у клінічному матеріалі через 2-3 год. з моменту його забору. Цим методом досліджують клітини циліндричного епітелію слизової оболонки носоглотки. МФА базується на світінні антигену у люмінесцентному мікроскопі. Локалізація і характер світіння антигену залежать від стадії репродукції вірусу у чутливій клітині, а також від тривалості грипозної інфекції [81]. Проте, на сьогоднішній МФА рідко застосовують через його низьку чутливість та специфічність.

Метод ІХА (імунохроматографічний аналіз) є порівняно молодим методом діагностики (його також називають в літературі як метод сухої імунохімії, експрес-тест, QuikStrip cassette) [82]. В основі цього методу лежить специфічна взаємодія антиген-антитіло на хроматографічній мембрані після її змочування рідиною досліджуваного зразка. Введений у тест-систему індикаторний імунний компонент дифундує у хроматографічній мембрані і зупиняється знов у контрольній смугі внаслідок імунологічної взаємодії з іммобілізованим там імунним компонентом іншої специфічності. Забарвлення контрольної смуги свідчить, що дослідження відбулося коректно. Облік результатів проводиться візуально. Чутливість реакції сягає 0,5 нг/мл. Тривалість дослідження — 15 хвилин [83-86].

Як наслідок появи резистентності до озельтамівіру серед сезонних вірусів А(Н1N1) протягом кінця 2007 - початку 2008 рр. постала потреба проводити нагляд за чутливістю циркулюючих вірусів грипу до інгібіторів нейрамінідази в усьому світі. Наразі розроблено два методи, що використовуються з метою визначення чутливості до інгібіторів нейрамінідази, а саме – метод визначення інгібіції нейрамінідазної активності з обліком хемілюмінесценції, розроблений в Центрі контролю та профілактики хвороб (CDC, США), а також – метод визначення інгібіції нейрамінідазної активності MUNANA, розроблений в Інституті Медичних досліджень (NIMR, Великобританія) з обліком флуоресценції. Інгібітори нейрамінідази пригнічують здатність NA відрізати сіалову кислоту від

додаткового радикалу цукру. Нейрамінідазна активність та чутливість до інгібіторів може бути визначена завдяки використанню флуоресціюючого субстрату, MUNANA. Проведення цього аналізу у присутності інгібітору NA дозволяє визначити концентрацію препарату, яка необхідна для зниження нейрамінідазної активності на 50% (IC_{50}). Для застосування в практичних лабораторіях метод визначення нейрамінідазної активності з обліком флуоресценції підходить більше, зокрема тому, що він дешевший [88-93].

Використання серологічних методів у діагностиці вірусу грипу відіграє важливе значення, через постійні зміни антигенних детермінант, що в свою чергу впливає на інфекційність збудника та перебіг інфекції.

2.2. Дослідження генетичних змін у вірусів грипу

Генетичний аналіз генів вірусу грипу (особливо генів гемаглютиніну та нейрамінідази) може бути використаний для ідентифікації невідомого вірусу грипу у разі, якщо антигенні характеристики не можуть бути визначені. Генетичний аналіз також може бути використаний для моніторингу еволюції вірусів грипу та визначення ступеню спорідненості між вірусами, які виділені в різних географічних зонах.

Ідентифікація ізолятів вірусу грипу молекулярними методами є швидким та потужним методом. Полімеразна ланцюгова реакція із зворотньою транскрипцією (RT-PCR) дозволяє шаблону вірусної РНК бути зворотньо транскрибованою, на якій будується комплементарна ДНК (сDNA), яка може бути ампліфікована та детектована (якій, яка .. перефразуй). Цей метод може бути використаний при безпосередньому дослідженні клінічних зразків, а швидке одержання результатів може значно полегшити розслідування спалахів респіраторних захворювань [94,95].

Основним методом встановлення нуклеотидної послідовності геному є сиквенування. Метод сиквенування та подальшого генетичного аналізу – є найбільш складним та високовартісним методом [96]. Основна мета процесу сиквенування полягає у встановленні нуклеотидної послідовності тих чи інших генів (фрагментів ДНК або РНК).

Сиквенування вірусів грипу з усього світу виконується Глобальною Мережею Нагляду за грипом ВОЗ (WHO Global Influenza Surveillance Network (GISN)) щоб контролювати динаміку і важливість змін в популяціях циркулюючих вірусів протягом часу. Більшість цієї роботи зосереджується на регіонах геному грипу, які визначають зміни в антигенних властивостях та сприйнятливості до хіміотерапевтичних препаратів [97].

Окремим методом генетичного аналізу є метод піросиквенування. Це сиквенування коротких ділянок певних генів для виявлення специфічних мутацій, які асоціюються з особливими властивостями, зокрема – резистентністю до противірусних препаратів (амантадину, римантадину, озельтамівіру, занамівіру, перамівіру, ланонімівіру т.і.) або підвищеною патогенністю (пошук мутації в гені гемаглютиніну пандемічного вірусу грипу A(H1N1)pdm09). Він є дешевшим, ніж сиквенування, але слугує виконувати лише окремі завдання [98,99].

Потужні інструменти молекулярної генетики в даний час використовуються для дослідницьких та наглядових цілей у більшості питань з грипу. Подібні дослідження здійснюються в розвинутих країнах для моніторингу еволюційних змін вірусів грипу, виявлення швидкості та динаміки їх мутацій та для прогнозування еволюційного процесу збудників [100,101,102]. Крім цього, одержану інформацію щодо філогенетичних зв'язків між вірусами з успіхом використовують для формування складу грипозних вакцин на наступні епідемічні сезони [100].

Також нові зусилля спрямовані на прогнозування штамів, що будуть домінувати в наступному епідемічному сезоні [103]. Філогенетичний аналіз здатний розрізнити штами вірусів грипу, які мають ідентичні антигенні властивості [104].

Результатом філогенетичного аналізу є побудова філогенетичного дерева, де показані еволюційні зв'язки між досліджуваними об'єктами (гени або їх ділянки, амінокислотні чи нуклеотидні послідовності тощо)[105].

Важливим моментом при побудові дерева є вибір кореневого елемента, від якого залежить інформативність отриманих результатів. Зазвичай обирають близькоспоріднений організм, який не входить у групу досліджуваних об'єктів [106,107].

Робота з генетичною інформацією загалом включає отримання нових послідовностей, їх редагування та зберігання, вирівнювання з відомими у світі послідовностями та власне філогенетичний аналіз [107].

Більшість дослідників використовують комбінацію різних методів досліджень для одержання оптимального результату, часто – для вирішення нестандартних завдань [108,109].

Отже, вивчення антигенних та генетичних особливостей вірусів грипу, що циркулюють на певній території, враховуючи їх мінливість, мають проводитись сучасними методами на постійній основі.

РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Матеріали та обладнання, використані у роботі

Матеріалом для досліджень використовували зразки від хворих на грипоподібні захворювання (ГПЗ) та тяжкі гострі респіраторні захворювання (ТГРЗ): мазок із носу, носоглотки або ротоглотки, та ізоляти вірусів грипу з чотирьох дозорних центрів (міста Київ, Одеса, Дніпропетровськ та Хмельницький) та інших міст (18 лікувально-профілактичних закладів, з них 10 стаціонарів та 8 поліклінік, в тому числі педіатричних). Матеріал відбирався у амбулаторних хворих, що підходили під ознаки випадків грипоподібного захворювання (ГПЗ) та у госпіталізованих пацієнтів, що відповідали визначенню випадків тяжкого гострого респіраторного захворювання (ТГРЗ), а не в усіх хворих з ознаками ГРВІ або грипу, як це проводиться в системі рутинного епіднадзора. Саме критерії визначення випадків, запропоновані ВООЗ [110] дали змогу більш чітко проводити епідеміологічну вибірку для кращої репрезентативної інформації та оцінки даних [111].

Виділення та накопичення вірусів грипу проводили на культурі клітин (КК) MDCK, отриманій з нирки самки кокер-спанієля (S.H. Madin, N.B. Darby) [112]. Також, ізоляти, позитивні в ПЛР на грип виділяли на генетично-модифікованій культурі клітин MDCK-SIAT, одержаній з Світового центру грипу (Атланта) [113].

Нуклеїнову кислоту (РНК) виділяли з використанням комерційного набору Instant Virus RNA Kit (Analytik Jena). Приготування реакційної суміші проводили із застосуванням набору AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit (Ambion) та набору праймерів і зондів з двома мітками (Taqman) на цільові гени, надісланих Центром по контролю за інфекціями (CDC, Атланта, США). Позитивні контролі, що використовували в дослідженні: на сезонний (А, В, Н1, Н3), пандемічний (A/pdm, H1pdm09), пташиний (Н5) та РНК клітинного походження (RP) були отримані разом із праймерами і зондами (CDC, Атланта, США).

Для проведення ампліфікації використовували прилад 96-лункового формату ПЛР в реальному часі Applied Biosystems™ real-time PCR 7500.

Вірусологічні дослідження проводились на базі відділу респіраторних та інших вірусних інфекцій (далі – Відділ) ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського НАМН України». Їх обсяг наведено в таблиці нижче.

Таблиця 3.1.

Обсяг виконаної роботи

№ п/п	Об'єкт/предмет вивчення	Кількість досліджень	
		Всього	У тому числі власні
1.	Досліджено зразків методом real-time RT-PCR	1341	1341
2.	Ідентифіковано вірусів грипу на рівні типу та підтипу методом real-time RT-PCR	463	463
3.	Виділено вірусів грипу на культурі клітин MDCK та MDCK- SIAT,	671	259
4.	Ідентифіковано вірусів грипу на рівні штаму методом РГГА	152	152
5.	Проведено генетичний аналіз послідовностей сиквенованих вірусів грипу	49	49
6.	Побудовано філогенетичні дерева методом NJ	18	18

3.2. Методи досліджень

Для досягнення поставленої мети та виконання завдань, в процесі роботи були використані такі методи дослідження: вірусологічні, серологічні, молекулярно-генетичні, епідеміологічні, філогенетичні та статистичні.

Сиквенування виділених в Україні вірусів грипу було проведено у Світовому центрі грипу в Лондоні та в Центрі по контролю за захворюваністю (CDC, Атланта).

3.2.1. Методика культивування культури клітин MDCK і MDCK-SIAT

Ізоляція вірусів грипу на культурі клітин дозволяє отримати «живий» вірус грипу, накопичити його до необхідної концентрації для подальшого сиквенування. Тривалий час вірус грипу досліджували біологічним методом, заражаючи тварин (свиней, тхорів, мишей) матеріалом від хворого [114], згодом винайшли, що можна проводити ізоляцію вірусів грипу на курячих ембріонах. Цю методику застосовують і сьогодні, бо він дозволяє накопичити вірус в великій концентрації, що використовують задля виготовлення вакцин проти грипу. Але цей метод більш трудомісткий, вимагає більших зусиль та часу, аніж ізоляція вірусу на культурі клітин, а також останнім часом виявилось, що віруси грипу, особливо це стосується вірусів A(H3N2), не мають здатності зв'язуватися з клітинами хоріоналантаїсної оболонки курячого ембріону і не накопичуються в ньому, це призводить до неможливості ізоляції вірусів грипу на курячих ембріонах. Ізоляцію вірусів грипу проводили на культурі клітин MDCK.

MDCK-SIAT1 – це культура клітин, що була штучно створена - трансформована за допомогою ферменту CMP-N-ацетилнейрамінат: β -галаксиду, що каталізує α -2,6-сіалізацію галактози на глікопротеїнах або глікопротеїдах. Ці додаткові рецептори повинні збільшити кількість зв'язків між віріонами грипу людини та поверхнями клітин. Ця КК має здатність надекспресувати α -2,6- зв'язаний рецептор у порівнянні з клітинами MDCK та вважається її альтернативою [115].

До Відділу надійшло два види культури з Інституту грипу РАМН (м. С. – Петербург) та один вид - генетично модифікована культура клітин MDCK – SIAT, з Світового центру грипу (Атланта).

Розпочинали роботу з культурою клітин з приготування необхідних розчинів:

Ростове середовище: до середовища DMEM додавали телячої ембріональної сироватки (ТЕС), глютаміну, П/С (пеніцилін/стрептоміцин). Розчин можна зберігати при +4°C протягом 2 тижнів.

Розчин трипсину: до дистильованої води додавали трипсин. Фільтрували розчин через 0,2 мкм мембранний фільтр. Розливали по 1 мл в пробірки з щільно підігнаними пробками. Протягом терміну використання - 2 роки від дати приготування зберігали замороженим при -20°C.

Розчин Хенкса з трипсином (для промивки): до розчину Хенкса додавали приготований розчин трипсину (2 мкг/мл кінцева концентрація). Цей розчин готували кожного дня (ex tempore). Розчин придатний для роботи лише протягом одного дня.

DMEM підтримуюче середовище + трипсин: до середовища DMEM додавали: глютаміну (2 мМ кінцева концентрація), П/С (пеніцилін + стрептоміцин), ТСА (телячий сироватковий альбумін), HEPES (сольовий розчин). Приготоване підтримуюче середовище зберігали при температурі +4° С протягом тижнів.

В день зараження клітин до 100 мл підтримуючого середовища додавали 0,2 мл розчину трипсину (2 мкг/мл кінцева концентрація). Цей розчин був придатний до використання лише протягом одного робочого дня. Додавання трипсину в розчин для промивання та в підтримуюче середовище сприяло розщепленню гемаглютиніну вірусу грипу, послабленню міжклітинних зв'язків та кращій адсорбції вірусу на їх поверхні.

Субкультивування проводили кожні 4-7 днів для запобігання старіння культури клітин і зниження її чутливості до вірусів грипу. Із матрацу з моношаром клітин MDCK/MDCK-siat видаляли ростове середовище і

відмивали клітини невеликим об'ємом розчину трипсину EDTA. Легким покачуванням відмивали клітинний моношар протягом 1 хвилини і потім видаляли розчин. Процедуру повторювали, після вносили розчин трипсину в об'єм, який тільки покриває моношар клітин, і ставили в термостат (37°C) на 30 хвилин і більше до повного сповзання клітин.

Після сповзання клітин для припинення подальшої дії ферментів в матрац вносили ростове середовище, піпетували та розливали по матрацам чи флаконам (пробіркам) і ставили в термостат (37°C) для росту моношару [112].

3.2.2. Методика зараження культури клітин MDCK і MDCK-SIAT

Для первинного зараження використовували пробірки з моношаром клітин MDCK (конфлюєнтність 80-90%). З флаконів видаляли ростове середовище і тричі відмивали клітини 1,0 мл розчину Хенкса з трипсином. Середовище видаляли, а на моношар 2 флаконів вносили по 0,2 мл змиву від хворого. Інкубували 30-60 хв. при 34°C. Потім, у всі пробірки вносили по 1мл підтримуючого середовища із доданим трипсином, інкубували при 34°C в термостаті (бажано з подачею 5% CO₂), контролюючи кожного дня стан моношару.

У разі відсутності вираженої ЦПД і негативному результаті РГА проби витримували до 12 днів, потім заморожували-розморожували при температурі нижче -70°C. Після цього проводили наступний пасаж. При вираженій ЦПД і позитивній РГА - проба вважається позитивною і наступним етапом було закріплення і накопичення вірусу в великому об'ємі. Між зараженнями проби зберігали при температурі -70°C і нижче.

Накопичення вірусів проводили в культуральних матрацах або флаконах з моношаром клітин MDCK, площиною 25 см² (і більше).

Перед процедурою зараження моношар клітин відмивали двічі основним середовищем в об'ємі 5 мл, а потім вносили вірусовмісну рідину

в об'ємі 0,5 мл (зазвичай використовують розведення, ступінь якого залежить від вихідного титру).

Похитуючими рухами, обережно, розмішували вірусовмісну рідину на поверхні моношару клітин і залишали на інкубацію при 34°C на 30-60 хв., періодично похитуючи матраци. Після цього додавали підтримуюче середовище в об'ємі 10-12 мл і залишали в термостаті (34°C), контролюючи наявність ЦПД [112].

При вираженому ЦПД (розрив моношару, закруглення і сповзання клітин) клітини переносили в центрифужні пробірки і центрифугували при 1500 - 2000 об/хв. 10-15 хв. Відібраний супернатант використовували для типування в РТГА з грипозними діагностичними сироватками.

Накопичення вірусів проводили в культуральних матрацах або флаконах з моношаром клітин MDCK, площиною 25 см² (і більше). Відібраний супернатант використовували для типування в РТГА з грипозними діагностичними сироватками та передачі до Світового центру контролю за інфекціями (CDC, Атланта) для подальшого аналізу.

3.2.3. Постановка реакції гальмування гемаглютинації (РТГА)

Для визначення титру вірусу в пробі, та для постановки РТГА проводили реакцію гемаглютинації на стерильних полістеролових планшетах. Для постановки РГА необхідні: вірусвмістний матеріал, суспензія еритроцитів (морської свинки, людської крові І групи чи півня), фізіологічний розчин. Спочатку готували дворазове розведення вірусу від 1:2 до 1:1024. Для цього в ряд лунок наливали фізіологічний розчин. Потім до лунки 1 вносили вірусвмістний матеріал, тричі піпетували і переносили до 2 і т.д. до потрібного розведення. З останньої лунки видаляли частину суміші у дезінфікуючий розчин. Гемаглютинація залежить від температури та рН середовища. Час завершення аглютинації неоднаковий. В нашому випадку - 60 хвилин при кімнатній температурі. Протягом РГА виділяють

фазу адсорбції вірусу на еритроцитах, фазу аглютинації агрегатів вірусу з еритроцитами та елюції вірусу з еритроцитів.

Аналіз результатів реакції здійснювали за трихрестовою системою. За титр вірусу вважали те найбільше його розведення, при якому спостерігалася позитивна реакція гемаглютинації [116].

Визначивши у реакції гемаглютинації титр вірусу, ми готували робочу дозу антигену, яка містила 4ГО (гемаглютинуюча одиниця) у робочому об'ємі. Після приготування робочої дози контролювали в ній вміст вірусу. Для цього в 4 лунки вносили фізіологічний розчин, в першу лунку додавали такий самий об'єм приготованої робочої дози антигену, і розбавляли вдвічі в кожній наступній лунці — всього чотири лунки. Потім в кожен лунку додавали такий же об'єм 1% суспензії еритроцитів морської свинки. Через 60 хвилин визначали кількість вірусу в робочій дозі.

Приготувавши робочу дозу вірусу, розбавляли сироватки з метою визначення типоспецифічних антитіл в них до вірусу грипу. Спочатку сироватки розбавляли фізіологічним розчином до 1:10 в пробірках, а потім у планшетах для імунологічних реакцій таким чином, що в першій лунці отримували розведення 1:20, в кожній наступній розводили суміш вдвічі, з останньої один об'єм виливали. Після цього в кожен лунку з розведеною сироваткою додавали по одному об'єму робочої дози вірусу. Планшет накривали кришкою і залишали у термостаті на 20 хвилин для сполучення вірусу з антитілами. Після інкубації додавали по одному об'єму у кожен лунку 1% суспензію еритроцитів і залишали ще на 60 хвилин у термостаті при +24°C. Після цього проводили облік результатів реакції. Титром сироватки вважали останнє її розведення, в якому спостерігали гальмування гемаглютинації [117].

3.2.4. Процедура виділення РНК вірусів грипу

Для проведення виділення РНК брали зразки попередньо використані для зараження культури клітин (якщо виділення проходило в той самий день, зразки тримали при +4 °С, якщо пізніше ніж за добу — зберігали в морозильнику при -80 °С. Виділення РНК проводили на комерційному наборі InnuPREP Virus DNA/RNA Kit (Analytik Jena) за протоколом виробника.

Перед процедурою виділення:

- Готували буфер **Washing Solution HS** (при розпечатуванні нового набору): до флакона з буфером додавали вказаний на флаконі об'єм 96% етанолу.

- Готували буфер *Washing Solution LS* (при розпечатуванні нового набору): до флакона з буфером додавали вказаний на флаконі об'єм 96% етанолу.
- Готували протеїназу (*Proteinase K*). Висушена протеїназа зберігається при +4 °С. Флакон розводили з 1,5 мл ddH₂O і після використання зберігали при -20°С.
- Готували *Carrier Mix* розчин: розводили з 1,25 мл RNase free H₂O. Невикористаний *Carrier Mix* зберігали при -20°С. Не слід заморозувати/розморозувати його більше 3 разів.
- Приготування лізуючого розчину **CBV/Carrier Mix**.

Таблиця 3.2.

Приготування лізуючого розчину CBV/Carrier Mix.

Реагент	5 зразків	10 зразків	50 зразків	N x зразків
Лізуючий розчин CBV	1,2 мл	2,4 мл	12 мл	240 мкл x зразків
Carrier Mix	60 мкл	120 мкл	600 мкл	12 мкл x зразків

Лізуючий розчин CBV/Carrier Mix стабільний при +4 °С протягом 1 дня.

Процедура виділення нуклеїнової кислоти:

1. Виставляли 1,5 мл мікроцентрифужні пробірки відповідно кількості досліджуваних зразків, підписували (нумерували) та вносили до кожної пробірки по **200 мкл лізуючого розчину CBV/ Carrier Mix**. Додавали по **200 мкл зразків** до кожного епендорфу.
2. Додавали по 20 мкл **Proteinase K** до кожного епендорфу. Розмішували на вортексі протягом 10 сек. Інкубували при 70° С не менше 10 хв. постійно перемішуючи (використовуйте термошейкер). Після інкубації центрифугували на мікроцентрифузі «вортекс».

3. До всіх пробірок додавали по **400 мкл** зв'язуючого розчину **SBS**. Розмішували на вортексі протягом 10 сек.

4. Виставляли, відповідно кількості досліджуваних зразків, 2 мл **Receiver Tube** («низики») і поміщали в них таку ж кількість фіолетових **Spin Filter** (колонки), закривали кришечки, підписали. Перенесли весь об'єм зразку на колонки. Центрифугували протягом **1 хв** при **10 000*g**.

5. Заміняли нижні частини колонок (**Receiver Tube**). Додавали до колонок зі зразками по **500 мкл** розчину для відмивки **HS**. Центрифугували протягом **1 хв** при **10 000*g**. Заміняли нижні частини колонок (**Receiver Tube**) на нові.

6. Додавали до колонок по **650 мкл** розчину для відмивки **LS**. Центрифугували протягом **1 хв** при **10 000*g**. Заміняли нижні частини колонок (**Receiver Tube**) на нові.

7. Додавали до колонок по **650 мкл** розчину для відмивки **LS**. Центрифугували протягом **1 хв** при **10 000*g**. Заміняли нижні частини колонок (**Receiver Tube**) на нові.

8. Центрифугували зразки знову на максимальній швидкості **10000*g** швидкості протягом **5 хв**. (для видалення залишків етанолу), *(переносили необхідний об'єм **RNase-free water** (води) у розрахунку 80 мкл на 1 зразок до епендорфу і ставили на інкубацію при 70⁰ C)*

9. Виставляли 1,5мл мікроцентрифужні пробірки (**Elution Tube**), підписували відповідно внутрішньому лабораторному номеру зразка. Відкривали. Переносили фіолетові колонки у відкриті 1,5мл мікроцентрифужні пробірки. Обережно відкривали кришечки колонок та додавали по **60мкл RNase-free water** (води вільної від РНКаз). Інкубували при кімнатній температурі протягом **2 хв**. Центрифугували протягом **1хв** при **8000*g**.

***Рекомендовано:** проведення двох послідовних етапів елюції з використанням однакових об'ємів **RNase-free water** (напр., 30 мкл + 30 мкл), що може підвищити вихід вірусної РНК.*

10. Видаляли фіолетові колонки, у пробірок зі зразками виділеної РНК закриваємо кришечки. Якщо постановка ампліфікації була в той же день, то виділену РНК поміщали в холодильник. Зберігали відпрацьовану РНК протягом року в низькотемпературному морозильнику на -80°C .

3.2.5. Полімеразно-ланцюгова реакція

ПЛР проводили в режимі реального часу. Етап зворотної транскрипції і ампліфікації відбувався за один раунд постановки. Для постановки real-time RT-PCR готували реакційну суміш відповідно рекомендованої методики «Протокол полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в реальному часі (real-time RT-PCR) Центру по контролю за інфекціями (CDC, Атланта, США) для виявлення та дослідження пандемічного А(H1N1)рdm та сезонних вірусів грипу (версія 2009)».

Дослідження виконували згідно методики, затвердженої Вченою Радою ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім.Л.В. Громашевського НАМН України (Протокол № 4 від 05.07.2011р.).

Приготування реакційної суміші Master Mix.

Компоненти суміші Master Mix: набір для приготування реакційної суміші (Thermo Scientific Verso 1-Step qRT-PCR ROX Kit); набір праймерів і зондів з двома мітками (Taqman) надіслані Центром по контролю за інфекціями (CDC, Атланта, США).

Суміші для реакцій готували у вигляді коктейлів у 1,5мл мікроцентрифужних пробірках і вносили в лунки 96-лункового планшету. Кількість реакцій (N), які повинні ставитися для одного аналізу визначали за формулою: $N = n + 2$, де n — число проб включаючи позитивний та негативний контроль. Кількість реагентів реакційної суміші розраховували за схемою (Табл.4.2):

Схема розрахунку реагентів для приготування реакційної суміші

Реагент	Об'єм реагенту, необхідного для реакції, мкл
Вода без нуклеаз	$N * \times 4,5$ мкл
Прямий праймер Fp	$N * \times 0,5$ мкл
Зворотній праймер Rp	$N * \times 0,5$ мкл
Зонд Probe	$N * \times 0,5$ мкл
2X 1-Step qPCR Low ROX Mix	$N * \times 12,5$ мкл
Verso Enzyme Mix	$N * \times 0,25$ мкл
RT Enhancer	$N * \times 1,25$ мкл
Загальний об'єм	$N * \times 20,0$ мкл

Примітка: * N – кількість реакцій, що ставляться для одного аналізу:

- якщо число проб (n), включаючи контролю = 1-14, тоді $N = n + 1$;
- якщо число проб (n), включаючи контролю > 15, тоді $N = n + 2$.

Внесення компонентів реакції на плашку.

1. За індивідуальною схемою (залежить від кількості досліджуваних зразків та цільових генів аналізу) до кожної лунки плашки для ПЦР на 96 лунок додавали по 20 мкл кожної суміші мастер-мікс в горизонтальному порядку. Якщо тестували на всі гени, вносили у такому порядку: 1-й ряд на грип А, 2-й ряд на грип В; 3-й – на Н1 сезонного грипу А; 4-й – на Н3 сезонного грипу А; 5-й – на РНК клітинного походження РР; 6-й – на М-білок свинячого грипу Аsw; 7-й – на Н1sw; 8-й – на Н5 пташиного грипу Н5N1.

2. Потім вносили вертикально (зверху вниз) до кожної лунки по 5 мкл попередньо виділеної нуклеїнової кислоти, таким чином, щоб кожен зразок був протестований на усі цільові гени. Першим додавали негативний контроль (вода без нуклеаз) у лунки

першого стовпчика. В останній вертикальний ряд вносили позитивні контролю.

3. Після внесення всіх компонентів реакції плашку закривали оптичними кришечками чи оптичною плівкою для планшетів (Applied Biosystems).

Умови ампліфікації подані на таблиці 3.3.

Таблиця 3.4.

Умови ампліфікації приладу для ПЛР в реальному часі Applied Biosystems™ real-time PCR 7500

Зворотна транскрипція	50°C – 30 хв
Активація Tag інгібітора	95°C – 10 хв
ПЛР-ампліфікація (45 циклів)	95°C – 15 с
	55°C – 32 с

Обсяг реакційної суміші 25 мкл.

3.3. Побудова філогенетичних дерев за допомогою програми MEGA6

Для проведення філогенетичного аналізу (встановлення філогенетичної спорідненості) вірусів грипу, виділених протягом трьох досліджуваних епідемічних сезонів та раніше відомих ізолятів, ми застосували підходи та методи молекулярної філогенії. Щоб визначити філогенетичну подібність між українськими ізолятами та вірусами, виявленими у інших країнах, нами були побудовані філогенетичні дерева, [118].

Сиквенування виділених нами вірусів грипу проводилось у двох Світових центрах грипу в Лондоні та Атланті в рамках програми світового

нагляду за грипом. Сиквенси надіслані нам у форматі Fasta та розміщені з обмеженим доступом на новому ресурсі GISAID (<http://platform.gisaid.org/>), присвяченому вірусам грипу.

Пошук та вибірку необхідних послідовностей проводили за допомогою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) аналізу (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Вирівнювання послідовностей проводили із застосуванням алгоритму ClustalW [119].

Філогенетичні дерева будували у програмі MEGA 6.0. [120]. Для аналізу подібності досліджуваних послідовностей філогенетичні дерева будували методом дистанційним Neighbor-Joining (об'єднання найближчих сусідів) [121], із застосуванням моделі Кімури (Kimura 2-parameter) [122].

3.4. Статистична обробка результатів

Для статистичної оцінки значущості отриманих результатів застосовували метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій 1000-100 [123].

Для вирішення питання про значимість вибірових показників та оцінки вірогідності відмінностей між одержаними показниками результати були оброблені статистичним методом [124].

1. Для визначення величин, виражених у відсотках, визначали середню похибку відсоткового відношення за формулою:

$$mp = \frac{\sqrt{P(100-P)}}{n} \%, \text{ де}$$

mp - середня похибка в %;

P - одержана частота ознаки, що вивчається у %;

n - число спостережень у даному досліді.

2. Для визначення вірогідності різниці двох одержаних величин у %, визначали критерій t_p за формулою

$$t_p = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

де t_p – довірчий коефіцієнт;

P_1, P_2 – відносні величини, що порівнюються (%);

m_1, m_2 – середні похибки порівнюваних відсоткових відношень.

Чим більше значення t , тим вище ступінь вірогідності показника. Математично встановлено, що при $t=1$ вірогідність показника дорівнює 68%, при $t \geq 2$ та при $t > 3$ – відповідно 95,5% і 99,7%.

Показник вважається в достовірній мірі вірогідним, якщо $t \geq 2$, тобто, вірогідність його становить або перевищує 95%.

Оцінку достовірності отриманих результатів здійснювали за t -критерієм Ст'юдента. Результати оцінювали на рівні достовірності не більше $p < 0,05$. Крім цих методів було використано можливості програмного забезпечення Microsoft Excel та MEGA 6.0. [120].

РОЗДІЛ 4. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА АНТИГЕННА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ ГРИПУ, ЩО ЦИРКУЛЮВАЛИ В УКРАЇНІ З 2012 ПО 2015 РОКИ

Протягом трьох епідемічних сезонів на культурах клітин MDCK та MDCK-SIAT нами було виділено 671 польових ізолятів вірусів грипу, з яких у сезоні 2012-2013 років — 232 ізоляти; в 2013-2014 років — 168; в 2014-2015 років — 271 ізолят.

Типування та субтипуювання циркулюючих ізолятів проводили методом real-time RT-PCR. Всього методом ЗТ-ПЛР в реальному часі було

опрацьовано 1341 зразок: в сезоні 2012-2013 років — 654; в 2013-2014 років – 462; і в 2014-2015 років – 225.

Антигенну характеристику досліджували з використанням реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) зі спектром штамоспецифічних сироваток до референс-штамів для вірусів 2012-2015 років.

Нижче розлого подані результати досліджень для кожного з 3 епідемічних сезонів.

4.1. Аналіз вірусів грипу сезону 2012-2013 років.

Сезон 2012-2013 років був третім постпандемічним сезоном, оскільки 10 серпня 2010 року ВООЗ оголосила про завершення пандемії [125].

Епідемічний сезон грипу 2012- 2013 років в Україні характеризувався низькою інтенсивністю епідемічного процесу (показник захворюваності – 61,44 на 10 тис. населення) та досить пізнім піком підйому захворюваності – 11 - й тиждень 2013 року.[126]. Протягом досліджуваного сезону була сумісна циркуляція трьох різних вірусів: A/Victoria/361/2011(H3N2), A/California/1/2009 (A(H1N1)pdm09 та B/Wisconsin/01/2010 (генетичної гілки B/Yamagata). Кожен з цих вірусів не був новим для нашої країни, що і зумовило низький рівень інтенсивності епідемічного процесу в цьому сезоні [127].

Для сезону 2012-2013 років у Північній півкулі прогнозували циркуляцію вірусів грипу A/California/7/2009 (H1N1) - подібний вірус; A/Victoria/361/2011(H3N2) - подібний вірус та вірус грипу B/Wisconsin/01/2010, генетичної гілки B/Yamagata.

Методом ПЛР нами було опрацьовано 654 зразки від хворих. Перший лабораторно підтверджений випадок грипу був зареєстрований на 48 тижні року (листопад 2012 року).

За досліджуваній сезон на культурах клітин було виділено 232 вірусів грипу. Провідним збудником цього сезону були віруси підтипу

A(H1N1)pdm09 – 106 ізолятів, що склали $(45,6 \pm 3,3)$ % від загального числа виділених вірусів [126].

Другорядними збудниками епідемії були віруси грипу типу В – 66 ізолятів $(28,6 \pm 2,9)$ % і віруси грипу підтипу А(Н3N2) – 60 $(25,8 \pm 2,8)$ %. Структуру популяції виділених вірусів грипу у відсотках подано на рисунку 4.1.

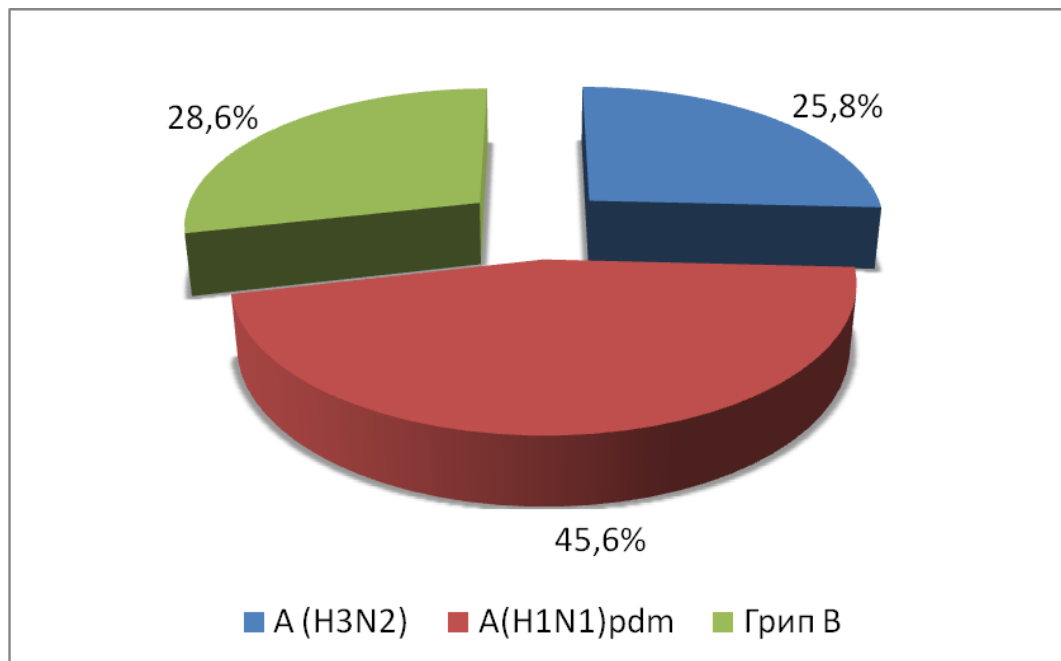


Рисунок 4.1. Структура популяції вірусів грипу сезону 2012-2013 років

У світі спостерігалась відмінна від України епідемічна ситуація. Домінуючим збудником були віруси грипу А(Н3N2) – $(31,1 \pm 3)$ %. Другорядну роль грали віруси грипу типу В двох генетичних гілок – В/Victoria та В/Yamagata і пандемічні віруси грипу.

Більшість вірусів А(Н3N2), які циркулювали протягом останніх років, не аглютинували курячі еритроцити, тому в роботі ми використовували еритроцити морської свинки [128].

Результати антигенної характеристики вірусів А(Н1N1)pdm09, виділених в Україні в сезоні 2012-2013 років, показали, що вони мали найбільшу спорідненість до референс-штаму А/California/07/2009 (H1N1), про що свідчить високий титр реагування (1:1280) з сироваткою до цього

штаму. Даний штам вже традиційно входить до складу вакцини з 2009 року та був рекомендований для сезону 2013-2014 років. Результати штамової ідентифікації представлені в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1.

Результати штамової ідентифікації вірусів А (H1N1) pdm, виділених в Україні в 2012-2013 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка	
	A/CALIFORNIA/07/2009	A/WASHINGTON/24/2012
A/CALIFORNIA/07/2009	1280	2560
A/WASHINGTON/24/2012	1280	2560
A/UKRAINE/226/2013	640	1280
A/UKRAINE/259/2013	1280	1280
A/UKRAINE/274/2013	1280	1280
A/UKRAINE/284/2013	640	1280
A/UKRAINE/317/2013	640	640
A/UKRAINE/347/2013	640	1280
A/KHMELNITSKY/360/2013	640	640

Усі досліджувані ізоляти реагували у високих титрах зі штамоспецифічними сироватками A/California/07/2009(H1N1) і A/Washington/24/2012. Проте, за результатами антигенного аналізу всі досліджувані віруси мали найбільшу спорідненість до штаму A/California/07/2009, особливо ізоляти A/Ukraine/259/2013 та A/Ukraine/274/2013 мали найвищі титри (1:1280) реагування з цією штамоспецифічною сироваткою. При взаємодії зі штамоспецифічною сироваткою A/Washington/24/2012 українські ізоляти проявили нижчу штамоспецифічність та мали нижчі титри реагування (1:640). Серед ізолятів найнижчі титри реагування мали A/Ukraine/317/2013 та A/Khmel'nitsky/360/2013.

Віруси грипу А (H3N2), за результатами антигенної характеристики, мали найбільшу спорідненість до штаму A/Victoria/361/2011, про що свідчить високий титр реагування з сироваткою до цього штаму (табл. 4.2).

Таблиця 4.2.

Результати штамової ідентифікації вірусів А (H3N2), виділених в Україні в 2012-2013 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка	
	A/VICTORIA/361/2011	A/TEXAS/50/2012
A/VICTORIA/361/2011	320	160
A/TEXAS/50/2012	1280	640
A/UKRAINE/313/2013	160	80
A/UKRAINE/314/2013	160	160
A/KHMELNITSKY/358/2013	80	80
A/UKRAINE/5491/2012	640	160
A/UKRAINE/387/2013	320	160
A/KHMELNITSKY/476/2013	160	80
A/DNIPRO/507/2013	320	160
A/DNIPRO/508/2013	160	320

Усі досліджувані ізоляти показали високі титри реагування зі штамоспецифічними сироватками A/Victoria /361/2011 та A/Texas/50/2012. Найвищий титр реагування зі штамоспецифічною сироваткою A/Victoria/361/2011 показали ізоляти A/Ukraine/5491/2012 (1:640), A/Ukraine/387/2013 (1:320) та A/Dnipro/507/2013 (1:320). Вірус A/Dnipro/508/2013 прореагував з штамоспецифічною сироваткою A/Texas/50/2012 у найвищому розведенні (1:320), всі інші виявили низьку антигенну спорідненість з даним штамом.

Результати визначення штамової приналежності ізолятів грипу В в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) представлені в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3.

Результати штамової ідентифікації вірусів В генетичної гілки
В/Yamagata, виділених в Україні в 2012-2013 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка	
	В/WISCONSIN/01/2010	В/MASSACHUSETTS/02/2012
В/WISCONSIN/01/2010	640	80
В/MASSACHUSETTS/02/2012	640	1280
В/UKRAINE/229/2013	320	640
В/UKRAINE/232/2013	320	640
В/UKRAINE/282/2013	640	320
В/UKRAINE/322/2013	320	640
В/UKRAINE/337/2013	320	640
В/UKRAINE/343/2013	320	640
В/UKRAINE/371/2013	640	320
В/UKRAINE/403/2013	320	640
В/KHMELNITSKY/483/2013	2560	5120
В/KHMELNITSKY/482/2013	640	2560

Усі досліджувані віруси прореагували зі штамоспецифічними сироватками В/Wisconsin/01/2010 та В/Massachusetts/02/2012. Результати антигенного аналізу вірусів грипу В показали, що польові ізоляти цього сезону мали найбільшу спорідненість до референс-штаму В/Wisconsin/01/2010, генетичної гілки В/Yamagata, про що свідчить високий титр реагування (1:640) з сироваткою до цього штаму, що дозволило віднести їх до Ямагатської гілки.

Ізоляти В/Ukraine/282/2013, В/Ukraine/371/2013 та В/Khmel'nitsky/482/2013 мали найвищі титри реагування (1:640) з сироваткою В/Wisconsin/01/2010. Найкраще з штамоспецифічною сироваткою В/Massachusetts/02/2012 прореагував ізолят В/Khmel'nitsky/482/2013. Вірус В/Khmel'nitsky/483/2013 мав надзвичайно високі титри реагування як з сироваткою В/Wisconsin/01/2010 (1:2560), так і з

B/Massachusetts/02/2012 (1:5120). Усі інші виділені ізоляти в низьких титрах прореагували з сироваткою B/Massachusetts/02/2012.

Таким чином, епідемічний сезон грипу 2012-2013 рр. був класичним поліетіологічним сезоном з превалюванням вірусу A(H1N1)pdm09, який розпочав циркуляцію ще в грудні 2012 року. В середині сезону переважали вірусу грипу A(H3N2), а віруси грипу B закінчували епідемічний сезон, що виявився незвичайно довгим – віруси виділялися навіть на початку травня 2013 року.

Антигенний аналіз показав, що віруси грипу A(H1N1)pdm09 мали найбільшу спорідненість до референс-штаму A/California/07/2009 (H1N1), A(H3N2) — до штаму A/Victoria /361/2011, а ізоляти грипу B прореагували у високих титрах з сироваткою B/Wisconsin /01/2010.

4.2. Аналіз вірусів грипу сезону 2013-2014 років

Епідемічний сезон грипу 2013 - 2014 років був низької інтенсивності (показник захворюваності – 66,11 на 10 тис. населення) з абсолютним переважанням в ньому збудника A/Texas/50/2012 (H3N2). Серед населення в Україні за сезон 2013-14 років зареєстровано 5,9 млн. випадків захворювань на грип та ГРВІ. Рівень захворювання становив 1294,6 на 100 тис. населення, що на 5,3% менше від попереднього сезону. Слід зазначити, що це був вже третій сезон поспіль, в якому домінуючим етіологічним чинником епідемії займав вірус грипу типу А. Це цілком могло зумовити досить низьку інтенсивність епідемічного процесу грипу цього епідемічного сезону. В сезоні 2013-14-го активність вірусу грипу типу В була найменшою за останні 5 сезонів.

Протягом епідемічного сезону 2013 - 2014 років було досліджено 356 клінічних зразків від хворих на грип та виділено 168 ізолятів вірусу грипу, серед них було виявлено 155 вірусів грипу типу А: A(H1N1)pdm09 – 7 ізолятів (4,2±1,5)%, A(H3N2) – 123 ізоляти (73,3±3,4)%, А

неідентифікований – 25 ізолятів ($14,8 \pm 2,7$)% та вірусів грипу типу В – 13 ізолятів ($7,7 \pm 2,0$)%. Структуру популяції виділених вірусів грипу у відсотках подано на рисунку 4.2.

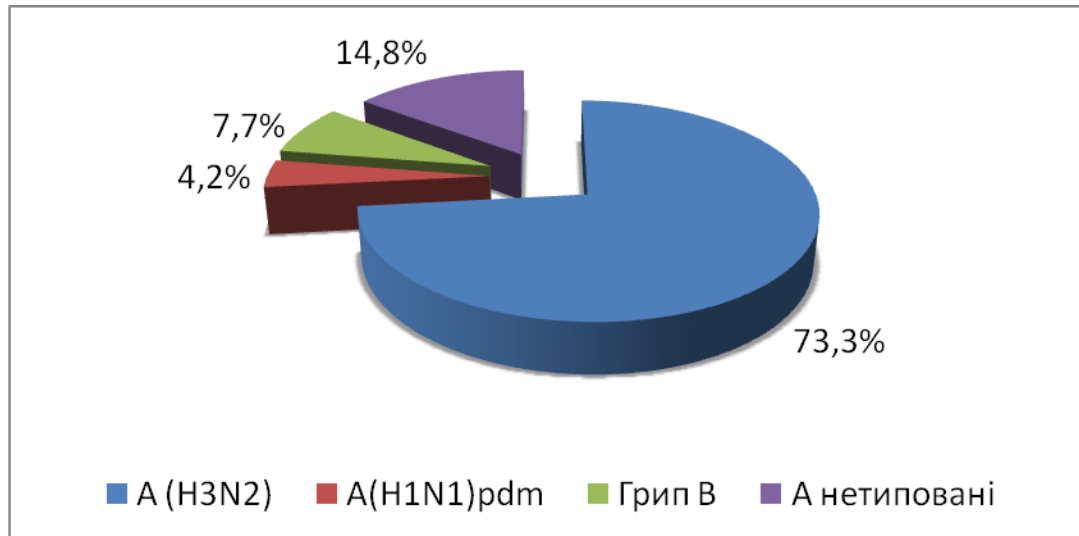


Рис 4.2. Структура популяції вірусів грипу сезону 2013-2014 роках

Домінуючими в світі цього сезону були віруси грипу А(Н1N1)pdm09, їх відсоток складав ($43,4 \pm 3,2$) %.

За результатами антигенного аналізу провідного збудника сезону 2013-2014 років віруси грипу А(Н3N2) мали найбільшу спорідненість до референс-штаму А/Texas/50/2012, про що свідчать дані отримані в РГГА (титр реагування з сироваткою до цього штаму 1:2560), представлені в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4.

Результати штамової ідентифікації вірусів А (Н3N2), виділених в Україні в 2013-2014 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка	
	А/Texas/50/2012	А/California/02/2014
А/Texas/50/2012	2560	1280
А/California/02/2014	160	320

A/UKRAINE/84/2014	2560	640
A/DNIPRO/384/2014	2560	1280
A/ZAPORIZZA/324/2014	640	320

Виділені ізоляти у високих титрах прореагували зі штамоспецифічними сироватками A/Texas/50/2012 та A/California/02/2014. Найбільшу спорідненість до референс-штаму мали ізоляти A/Ukraine/84/2014 та A/Dnipro/384/2014, про що свідчить найвищий титр (1:2560) реагування з сироваткою до цього штаму. Вірус A/Dnipro/384/2014 також у високому титрі (1:2560) прореагував з сироваткою A/California/02/2014, проте він був на порядок нижчий, ніж при реакції з сироваткою A/Texas/50/2012. Нижчий титр реагування зі штамоспецифічними сироватками A/Texas/50/2012 та A/California/02/2014 мав ізолят A/Zaporizza/324/2014 – з титрами реагування 1:640 та 1:320 відповідно, що говорить меншу спорідненість до референс-штамів.

Вірус грипу типу В відігравав другорядну роль в сезоні 2013-2014 років. За результатами антигенної характеристики польові ізоляти цього сезону мали спорідненість до референс-штаму B/Massachusetts/02/2012, про що свідчить високий титр (1:320) реагування з сироваткою до цього штаму [129]. Дані отримані в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) представлені в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5.

Результати штамової ідентифікації вірусів В, виділених в Україні в 2013-2014 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка	
	B/Brisbane/36/2012	B/Massachusetts/02/2012
B/Brisbane/36/2012	320	160
B/Massachusetts/02/2012	320	320
B/DNIPRO/313/2014	320	160

B/DNIPRO/338/2014	320	320
B/DNIPRO/341/2014	160	320
B/DNIPRO/385/2014	160	320
B/DNIPRO/386/2014	160	320

Антигенний аналіз показав, що всі віруси грипу В сезону 2013-2014 років прореагували в високих титрах зі штамоспецифічними сироватками B/Brisbane/36/2012 та B/Massachusetts/02/2012. Найвищий титр реагування (1:320) з сироваткою B/Brisbane/36/2012 проявили ізоляти B/Dnipro/313/2014 та B/Dnipro/338/2014. Інші віруси проявили нижчу антигенну спорідненість з даним штамом. При взаємодії з сироваткою B/Massachusetts/02/2012 майже всі ізоляти прореагували у титрі 1:320, лише вірус B/Dnipro/313/2014 мав дещо нижчий титр – 1:160.

За результатами антигенного аналізу вірусів грипу А (H1N1)pdm09, виділених в Україні в сезоні 2013-2014 років було показано, що польові ізоляти цього сезону мали найбільшу спорідненість до референс-штаму A/California/07/2009(H1N1) [130], про що свідчить високий титр реагування з сироваткою до цього штаму (табл. 4.6.).

Таблиця 4.6.

Результати штамової ідентифікації вірусів А (H1N1)pdm09, виділених в Україні в 2013-2014 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка	
	A/California/07/2009	A/Massachusetts/15/2013
A/California/07/2009	1280	2560
A/Massachusetts/15/2013	1280	2560
A/UKRAINE/183/2014	1280	2560
A/DNIPRO/133/2014	1280	2560

A/ODESSA/260/2014	2560	2560
A/ODESSA/261/2014	1280	2560
A/ODESSA/265/2014	2560	2560

Ізоляти вірусів грипу типу А (H1N1)pdm09 в високих титрах (1:2560) прореагували зі штамоспецифічними сироватками A/California/07/2009 та A/Massachusetts/15/2013. Віруси A/Odessa/260/2014 і A/Odessa/265/2014 мали найвищий титр (1:2560) реагування зі штамоспецифічною сироваткою A/California/07/2009(H1N1). Інші ізоляти також мали високий титр реагування, проте він був в два рази нижчий (1:1280).

Антигенний аналіз показав, що всі ізоляти мали титр 1:2560 при взаємодії з сироваткою A/Massachusetts/15/2013.

Отже, підйом захворюваності на грип та ГРІ в Україні 2013 - 2014 років характеризувався низькою інтенсивністю епідемічного процесу з переважною циркуляцією вірусів А(H3N2), а саме вірусів, подібних до штаму A/Texas/50/2012.

Антигенний аналіз ізолятів вірусів грипу отриманих в сезоні 2013-2014 років показав, що віруси грипу А(H3N2) мали найбільшу спорідненість до референс-штаму A/Texas/50/2012, віруси грипу В – до штаму B/Massachusetts/02/2012, а віруси грипу А (H1N1)pdm09 у високих титрах прореагували з штамоспецифічною сироваткою A/California/07/2009 (H1N1).

4.3. Аналіз вірусів грипу сезону 2014-2015 років

За даними ВООЗ в світі у сезоні 2014-2015 років переважали віруси грипу типу А(H3N2) (39,9±2,8) %, тоді як віруси грипу типу В зустрічались в меншій кількості (24,4±2,5) %.

Проте, етіологічна структура збудників в Україні була відмінною від такої в світі.

Провідним збудником сезону були віруси грипу типу В, генетичної гілки В/Yamagata [129], відсоткова частка яких становила $(64,2 \pm 2,9)\%$. Другорядними збудниками були віруси грипу А(H1N1)pdm09 – $(15,3 \pm 2,1)\%$ та А(H3N2) – $(7,3 \pm 1,6)\%$. Частка нетипованих вірусів грипу типу А становила $(13,2 \pm 2,0)\%$.

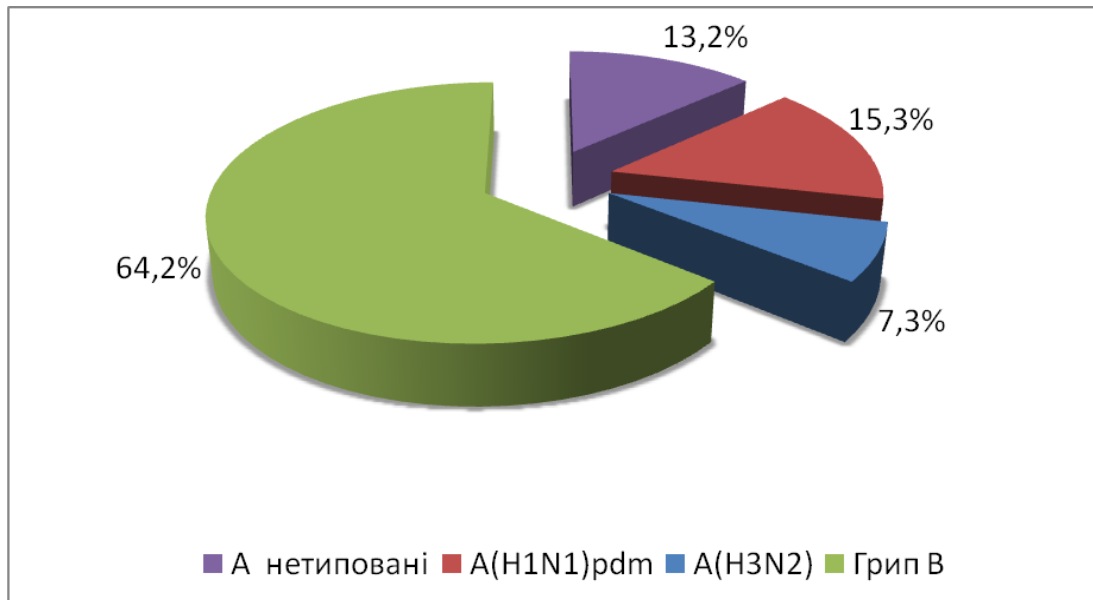


Рисунок 4.3. Структура популяції вірусів грипу сезону 2014-2015 роках

За результатами антигенного аналізу провідного збудника сезону 2014-2015 років віруси грипу В мали найбільшу спорідненість до референс-штаму В/Phuket/3073/2013, про що свідчать дані отримані в РГГА (титр реагування з сироваткою до цього штаму 1:1280), представлені на таблиці 4.7.

Таблиця 4.7.

Результати штамової ідентифікації вірусів В генетичної гілки В/Yamagata, виділених в Україні в 2014-2015 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка		
	В/Massachusetts/02/2012	В/Phuket/3073/2013	В/Hong Kong/3417/2014
В/Massachusetts/02/2012	640	80	320
В/Phuket/3073/2013	640	1280	320

B/Hong Kong/3417/2014	20	20	160
B/Zaporizza/339/2015	640	1280	320
B/Odessa/390/2015	640	1280	320
B/Odessa/386/2015	80	320	320
B/Odessa/392/2015	320	1280	320
B/Ukraine/143/2015	80	320	160
B/Ukraine/153/2015	160	320	320
B/Kharkov/263/2015	640	1280	320

За результатами антигенного аналізу, віруси грипу В у високих титрах прореагували зі штамоспецифічними сироватками В/Massachusetts/02/2012, В/Phuket/3073/2013 та В/Hong Kong/3417/2014. Найвищий титр реагування (1:640) з сироваткою В/Massachusetts/02/2012 мали ізоляти В/Zaporizza/339/2015, В/Odessa/390/2015 та В/Kharkov/263/2015. Інші віруси проявили нижчу антигенну спорідненість з даним референс-штамом.

Ізольовані віруси у найвищих титрах (1:1280) прореагували зі штамоспецифічною сироваткою до штаму В/Phuket/3073/2013, що говорить про їх найбільшу антигенну спорідненість. Лише деякі віруси мали нижчий титр реагування (1:320) - В/Ukraine/143/2015 та В/Odessa/386/2015.

При взаємодії з сироваткою В/Hong Kong/3417/2014 титр реагування був низьким (1:320) в порівнянні з іншими штамоспецифічними сироватками.

Віруси грипу А (H3N2), за результатами антигенної характеристики, мали найбільшу спорідненість до штаму А/Switzerland/9715293/2013, про що свідчить високий титр реагування з сироваткою до цього штаму (табл. 4.8).

Результати штамової ідентифікації вірусів А(Н3N2), виділених в
Україні в 2014-2015 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка		
	A/Texas/50/2012	A/Switzerland/9715293/2013	A/Stockholm/6/2014
A/Texas/50/2012	2560	320	640
A/Switzerland/9715293/2013	160	640	320
A/Stockholm/6/2014	320	640	320
A/Khmel'nitsky/467/2015	80	320	80
A/Khmel'nitsky/466/2015	40	640	320
A/Ukraine/165/2015	320	40	80
A/Ukraine/501/2014	320	320	160

Антигенний аналіз показав, що віруси грипу А(Н3N2) прореагували зі штамоспецифічними сироватками А/Texas/50/2012, А/Switzerland/9715293/2013 та А/Stockholm/6/2014. Найвищий титр реагування (1:320) з сироваткою А/Texas/50/2012 проявили ізоляти А/Ukraine/165/2015 та А/Ukraine/501/2015. Найнижчу спорідненість до сироватки А/Texas/50/2012 показав ізолят А/Khmel'nitsky/466/2015 (титр реагування 1:40), а до сироватки А/Switzerland/9715293/2013 - А/Ukraine/165/2015 (1:40).

Виділені ізоляти мали високі титри взаємодії зі штамоспецифічною сироваткою - А/Switzerland/9715293/2013, найвищий титр реагування (1:640) мав ізолят А/Khmel'nitsky/466/2015.

Дещо нижчі титри показали віділені ізоляти при реакції з сироваткою А/Stockholm/6/2014, що говорить про їх низьку антигенну спорідненість.

За результатами антигенного аналізу провідного збудника сезону 2014-2015 років віруси грипу А(Н1N1)pdm09 мали найбільшу

спорідненість до референс-штаму A/California/7/2009(H1N1), про що свідчать дані, отримані в РГГА (титр реагування з сироваткою до цього штаму 1:1280), які представлені у таблиці 4.9.

Таблиця 4.9.

Результати штамової ідентифікації вірусів A(H1N1)pdm09, виділених в Україні в 2014-2015 роках

Штам	Штамоспецифічна сироватка		
	A/California/7/2009	A/Hong Kong/5659/2012	A/South Africa/3626/2013
A/California/7/2009	1280	160	320
A/Hong Kong/5659/2012	640	1280	640
A/South Africa/3626/2013	1280	1280	1280
A/Khmel'nitsky/471/2015	2560	2560	1280
A/Ukraine/277/2015	2560	2560	1280
A/Ukraine/160/2015	1280	2560	1280
A/Ukraine/427/2015	1280	1280	1280
A/Dnipro/448/2015	640	640	1280
A/Ternopil/411/2015	640	1280	640
A/Dnipro/447/2015	1280	2560	640

У результаті антигенного аналізу було показано, що досліджувані ізоляти у високих титрах прореагували з штамоспецифічними сироватками A/California/7/2009, A/Hong Kong/5659/2012 та A/South Africa/3626/2013, що говорить про їх високу антигенну спорідненість. Найвищий титр реагування (1:2560) зі штамоспецифічною сироваткою A/California/7/2009 проявили ізоляти A/Khmel'nitsky/471/2015 та A/Ukraine/277/2015. Інші віруси в нижчих титрах прореагували з сироваткою. Також ізоляти показали високих титр реакції з штамоспецифічною сироваткою A/Hong Kong/5659/2012. Лише ізолят A/Dnipro/448/2015 прореагував в нижчому титрі (1:640).

З сироваткою до штаму A/South Africa/3626/2013 виділені віруси, окрім A/Ternopil/411/2015 та A/Dnipro/447/2015 (титр реагування 1:640), реагували в титрі 1:1280.

Антигенні властивості більшості вірусів грипу A(H1N1)pdm за весь досліджуваний період залишались відносно однорідними. Відмінності, що виникали при взаємодії з сироватками, свідчать або дають змогу зробити висновок про поступову антигенну зміну.

Віруси грипу A(H3N2) та віруси грипу B проявляли значно більшу антигенну варіацію, як видно з зміни антигенної спорідненості протягом 2012-2015 років.

4.4. Антигенна мінливість вірусів грипу, виділених в 2012-2015 роках

У результаті антигенного аналізу було показано постійну поступову зміну антигенних властивостей ізольованих вірусів грипу.

Як видно з титрів реагування зі штамоспецифічними сироватками, віруси грипу A(H1N1)pdm09 мали відносно низьку антигенну мінливість, та залишались подібними до штаму, що був рекомендований до складу вакцини протягом сезонів 2012-2015 років.

Таблиця 4.10.

Антигенна характеристика вірусів грипу A(H1N1)pdm09

Епідемічний сезон	Ізоляти вірусу грипу A(H1N1)pdm09	Титр інгібування	Референс штам
2012-2013 рр.	A/Ukraine/226/2013	640	
	A/ Ukraine /259/2013	1280	
	A/ Ukraine /274/2013	1280	

2013-2014 pp.	A/Odessa/261/2014	1280	A/California/7/ 2009
	A/ Odessa /265/2014	2560	
	A/Ukraine/183/2014	1280	
	A/Dnipro/133/2014	1280	
	A/Odessa/260/2014	2560	
2014-2015 pp.	A/Khmelnytsky/471/ 2015	2560	
	A/Ukraine/277/2015	2560	
	A/Dnipro/447/2015	1280	
	A/Ukraine/160/2015	1280	
	A/Ukraine/427/2015	1280	
	A/Ternopil/411/2015	640	

Антигенна мінливість вірусів грипу А(Н3N2) мала лінійний, поступовий характер, і кожен наступний варіант зберігав властивості попереднього.

Аналіз спектру антигенних варіантів вірусу грипу, що мали епідемічну значимість представлені в таблиці 4.11. ілюструють гетерогенність антигенних властивостей гемаглютиніна ізолятів, що циркулювали.

Таблиця 4.11.

Антигенна характеристика вірусів грипу А(Н3N2)

Епідемічний сезон	Ізоляти вірусу грипу А(Н3N2)	Титр інгібування	Референс штам
	A/ Ukraine /313/2013	160	

2012-2013 pp.	A/ Ukraine/ 314/2013	160	A/Victoria/361/ 2011
	A/Khmeltsky/358/ 2013	80	
	A/Ukraine/5491/2012	640	
	A/Ukraine/387/2013	320	
2013-2014 pp.	A/Ukraine/84/2014	2560	A/Texas/50/2012
	A/Dnipro/384/2014	2560	
	A/Zaporizza/324/2014	640	
2014-2015 pp.	A/Khmeltsky/467/2015	320	A/Switzerland/ 9715293/2013
	A/Khmeltsky/466/2015	640	
	A/Ukraine/165/2015	40	
	A/Ukraine/501/2014	320	

Для вірусів грипу В була також характерна мінливість у антигенному складі, в результаті чого змінювалась спорідненість до різних штамоспецифічних сироваток. Антигенний аналіз вірусів грипу В, що циркулювали в період 2012-2015 років представлений на таблиці 4.12.

Таблиця 4.12.

Антигенна характеристика вірусів грипу В

Епідемічний сезон	Ізоляти вірусу грипу В	Титр інгібування	Референс штам
	B/Ukraine/343/2013	320	B/Wisconsin/01/
	B/Ukraine/371/2013	640	
		320	

2012-2013 pp.	B/Ukraine/403/2013		2010
	B/Khmelnytsky/483/2013	2560	
	B/Khmelnytsky/482/2013	640	
2013-2014 pp.	B/Dnipro/338/2014	320	B/Massachusetts/ 02/2012
	B/Dnipro/341/2014	320	
	B/Dnipro/385/2014	320	
2014-2015 pp.	B/Zaporizza/339/2015	1280	B/Phuket/3073/ 2013
	B/Odessa/390/2015	1280	
	B/Ukraine/153/2015	320	
	B/Kharkov/263/2015	1280	

Віруси грипу А(Н1N1) pdm09 за антигенними властивостями належали до одного еталонного штаму A/California/7/2009.

Для вірусів грипу А(Н3N2) спостерігалась більша антигенна мінливість та протягом сезонів вони належали до трьох референс-штамів: A/Victoria/361/2011, A/Texas/50/2012 та A/Switzerland/9715293/2013.

Віруси грипу В також мали високу антигенну мінливість та протягом досліджуваних сезонів мали спорідненість до трьох референс-штамів: B/Wisconsin/01/2010, B/Massachusetts/02/2012 та B/Phuket/3073/2013.

Таким чином, антигенні властивості більшості вірусів грипу А(Н1N1)pdm09 за весь досліджуваний період залишались відносно однорідними. Відмінності у вірусів, виявлені в РГГА при взаємодії з їх сироватками свідчать про поступову зміну антигенних властивостей пандемічних вірусів.

Віруси грипу А(Н3N2) та віруси грипу В проявляли значно більшу антигенну варіацію, як видно з зміни антигенної спорідненості протягом 2012-2015 років.

4.5. Структура популяції вірусів грипу в 2012-2015 роках

Впродовж досліджуваних сезонів спостерігалась постійна зміна збудників, що відігравали головну роль у епідемічному процесі. Кожного сезону відсоткове співвідношення вірусів грипу, що викликали захворюваність змінювалась.

Протягом трьох сезонів циркулювали всі три збудники – А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) та В у різному відсотковому співвідношенні. Так, вірус грипу А(Н1N1)pdm09 грав ключову роль в епідемічному процесі 2012-2013 років, де його відсоткова частка становила $(45,6 \pm 3,3)\%$. А в сезоні 2013-2014 років його частка була найменшою – $(4,2 \pm 1,5)\%$, в той час як вірус грипу А(Н3N2) переважав та становив $(73,3 \pm 3,4)\%$. Як видно з діаграми (рис.4.4) $(25,8 \pm 2,8)\%$ вірусів грипу А(Н3N2) детектувалось в 2012-2013 роках, а в 2014-2015 їх циркулювало найменше – $(7,3 \pm 3,4)\%$.

Віруси грипу В переважали у 2014-2015 роках (табл.4.13), їх відсоткова частка становила $(64,2 \pm 2,9)\%$. Тоді як у сезоні 2012-2013 років – $(28,6 \pm 2,9)\%$ та протягом сезону 2013-2014 років найменше – $(7,7 \pm 2,0)\%$.

Таблиця 4.13

Статистичний аналіз домінуючих збудників досліджуваних сезонів

Сезон	Домінуючий збудник	Дані по Україні	Світові дані	Достовірність
		P±m _p (%)		
2012-2013	А(Н1N1)pdm09	45,6±3,3	16,6±2,4	p≥0,05
2013-2014	А(Н3N2)	73,3±3,4	17,3±2,4	p≥0,01
2014-2015	В	64,2±2,9	24,4±2,5	p≥0,01

У сезонах 2013-2014 та 2014-2015 років спостерігалась наявність вірусів грипу типу А, які не були субтиповані. Їх відсоткова частка становила $(14,8 \pm 2,7)\%$ та $(13,2 \pm 2,0)\%$, відповідно.

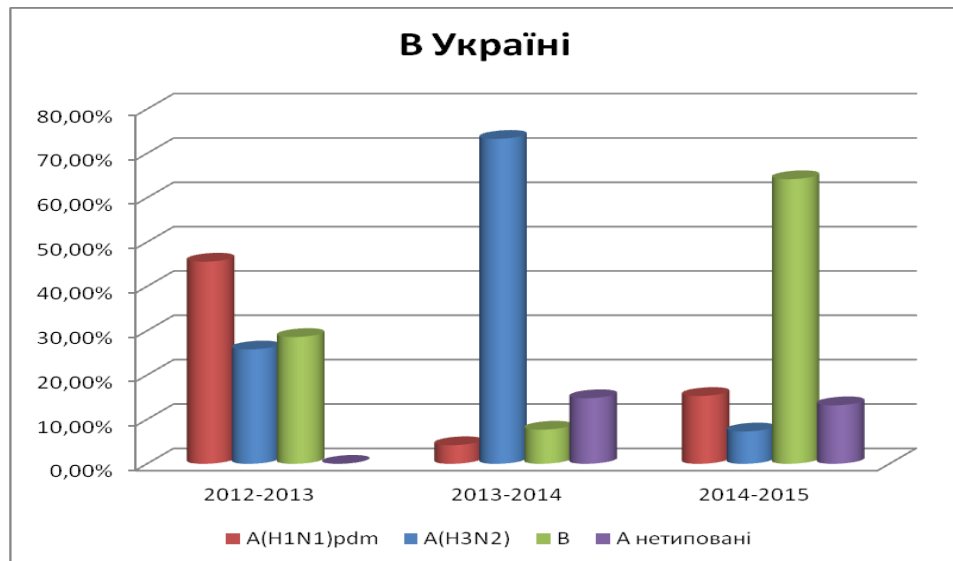


Рис.4.4. Структура популяції вірусів грипу в 2012-2015 роках в Україні

Станом на сезон 2012-2013 років в світі спостерігалось переважання вірусів грипу типу А, в середньому вони становили близько 70%, переважав вірус грипу субтипу А(Н3N2) - $(31,1 \pm 3,0)\%$, а в Україні - субтипу А(Н1N1)pdm09 (рис.4.5).

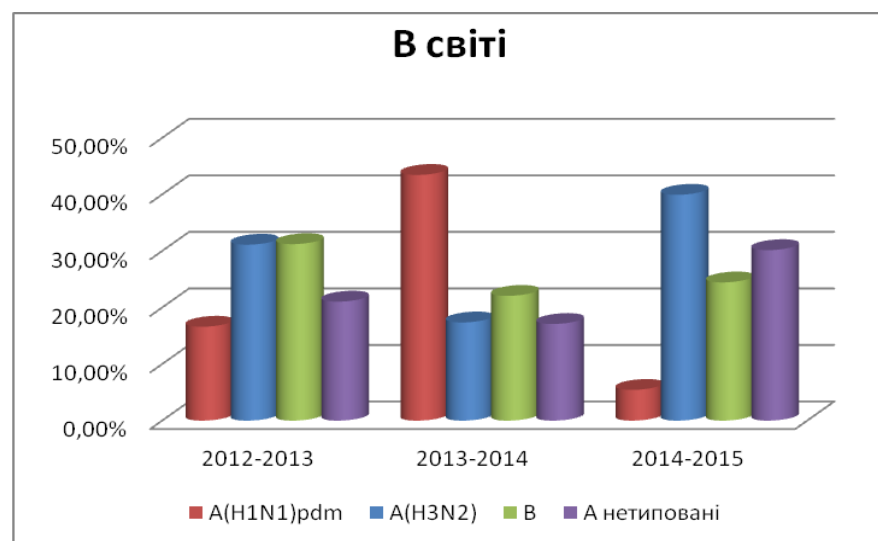


Рис.4.5. Структура популяції вірусів грипу в 2012-2015 роках в світі

Для європейського регіону ситуація була подібною до України [53].

У сезоні 2013-2014 спостерігалась протилежна ситуація. В Україні переважали віруси грипу А(Н3N2) ($73,3 \pm 3,4$)%, тоді як в світі - А(Н1N1)pdm09 ($43,4 \pm 3,2$)%. Віруси грипу В становили близько ($22,0 \pm 2,7$)% [53].

Ситуація в світі та європейському регіоні в сезоні 2014-2015 років відрізнялась від такої в Україні. В світі переважали віруси грипу типу А (близько 75% від загальної кількості), а саме А(Н3N2) ($39,9 \pm 2,8$)% (табл.4.13). Відсоткова частка вірусів грипу В була найменша – ($24,4 \pm 2,5$)%.

Таким чином, штамова структура популяції вірусів грипу, які циркулювали в Україні і світі у 2012-2015 роках, значно варіювала, як в залежності від сезону, так і в залежності від території.

Матеріали досліджень, викладені в цьому розділі, опубліковані [126,127,128,129,130].

РОЗДІЛ 5. ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ ЛЮДЕЙ ТИПУ А, ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ З 2012 ПО 2015 РОКИ

Впроваджений для вдосконалення дослідження генетичної мінливості збудників грипу філогенетичний аналіз вдало застосовується фахівцями в країні. Показано переваги застосування методу для детальної характеристики циркулюючих штамів. Віруси грипу типу А виділялися в усіх трьох досліджуваних епідемічних сезонах з 2012 по 2015 роки.

Генетичний аналіз традиційно проводили за генами, що кодують поверхневі антигени: гемаглютинін (НА) та нейрамінідаза (НА) кожного з субтипів вірусів грипу А: А(Н3Н2) та А(Н1Н1)рdm09. Сезонні віруси грипу А(Н1Н1) як в Україні, так і в світі, після 2008 року не виділялися. З 2010 року в світі не зареєстровано випадків виявлення чи виділення вірусів сезонного грипу і невідомо, чи зберігся цей вірус в людській популяції, чи був витіснений вірусом А(Н1Н1)рdm09.

Посезонний генетичний аналіз проводили методом Neighbor-Joining (об'єднування найближчих сусідів).

5.1. Генетична характеристика пандемічних вірусів грипу А(Н1Н1) рdm09

Віруси грипу А(Н1Н1)рdm09 вперше з'явилися у 2009 році внаслідок складних рекомбінаційних подій між вірусами грипу людей, свиней і птахів (ймовірно в організмі свині), отримавши у спадок сегменти від різних вірусів [131]. ВООЗ у 2009 році оголосила пандемію грипу А(Н1Н1)рdm09. Генетична характеристика пандемічних вірусів грипу, ізольованих в Україні, де відсоток тяжких наслідків та смертей від грипу був порівняно високим, була вкрай важливим завданням.

Аналіз пандемічних вірусів грипу А(Н1N1)pdm09 сезону 2012-2013 років

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютиніну (HA)

Результатом філогенетичного аналізу є дендрограма, подана на рис. 6.1, на якій показано, що протягом епідемічного сезону 2012-2013 років в Україні циркулювали різні варіанти пандемічних вірусів грипу, які, однак, зберегли подібність до вакцинного штаму на досить високому рівні — 97%.

Усі взяті для аналізу послідовності показали амінокислотні заміщення в гемаглютиніні P83S, S203T і I321V порівняно з вакцинним штамом A/California/07/2009(H1N1). Заміщення E347K, S451N і S185T були виявлені у всіх ізолятів, виділених за 2012-2013 рр., а також у деяких раніше ізольованих штамів [132] (рис. 5.1).

Українські ізоляти розташувались у трьох генетичних групах:

1 Група — A/St.Peterburg/100/2011-подібні. Характеризувались амінокислотними заміщеннями S143G і A197T. У більшості ізолятів були виявлені S84D і K163 мутації, а у ізолятів зі США і нашого штаму A/Zaporizka/417/2013 також D84G.

Усі ізоляти, окрім вірусів першої групи, набули заміщення D97N.

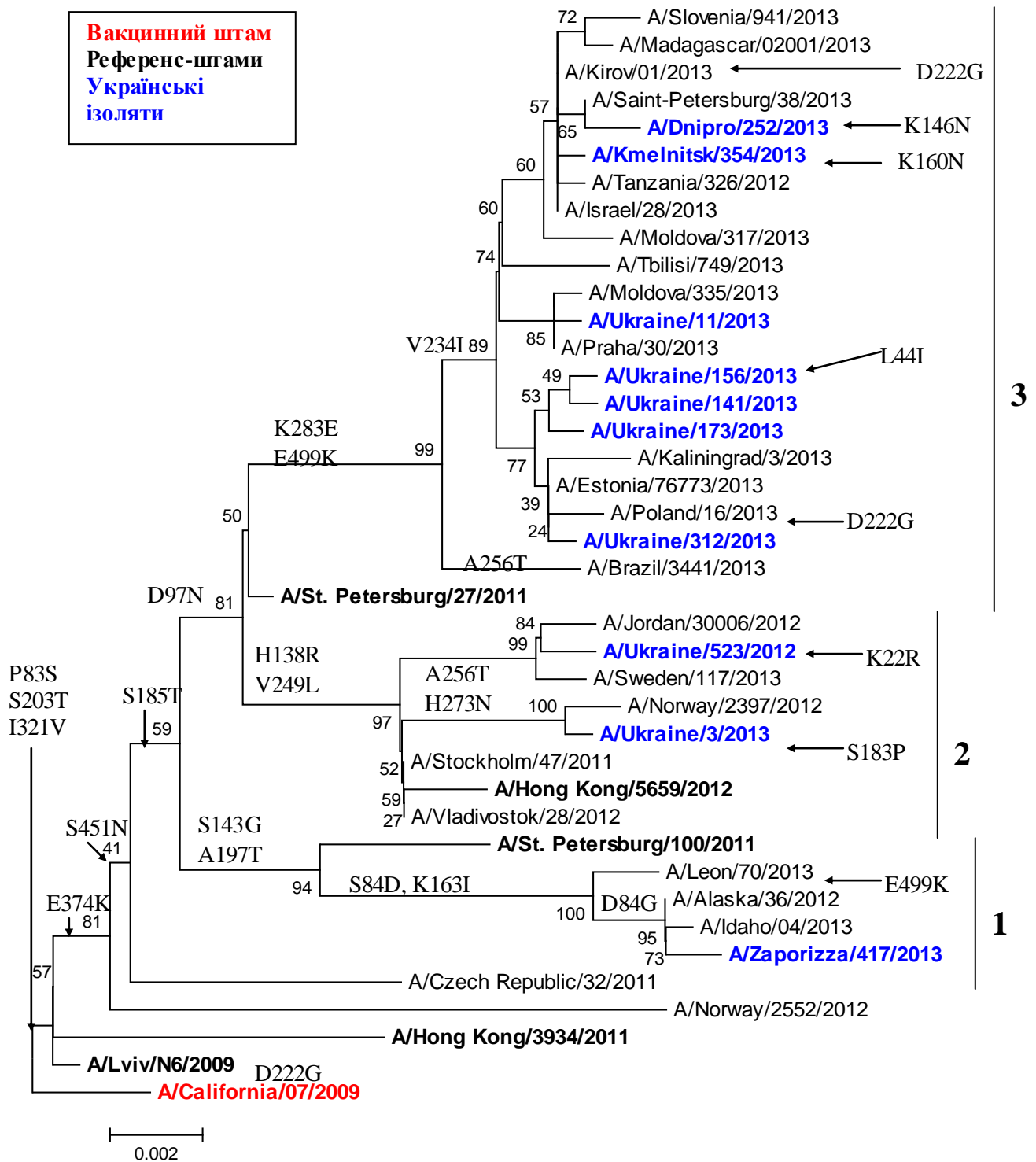


Рисунок 5.1. Філогенетичне дерево вірусів грипу A(H1N1)pdm09 сезону 2012-2013 за нуклеотидними послідовностями HA, побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

2 Група — A/Hong Kong/5659/2012-подібні. Це ізоляти із заміщеннями H138R і V249L. До другої групи увійшли: український ізолят

A/Ukraine/3/13 із додатковим заміщенням K22R і A/Ukraine/523/13 із заміщеннями A256T і H273N (разом з вірусом з Норвегії), та S183P.

3 Група — A/St.Peterburg/27/2011-подібні. У всіх вірусів групи, окрім референс-штаму були виявлені заміщення K283E і E499K, а окрім ізоляту з Бразилії — V234I. Дана група об'єднала найбільше українських ізолятів, в яких були виявлені поодинокі АК заміщення: K146N — у A/Dnipro/252/13, K160N — у A/Kmelnytsk/354/13 і L44I — у A/Ukraine/156/13. У двох ізолятів (з Кірова і Польщі) спостерігалось заміщення D222G, з яким, за літературними даними, асоціюють ускладнення перебігу грипозного захворювання [133].

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

Результати філогенетичного аналізу, подані на рисунку 5.2, показують, що мінливість гену нейрамінідази була менш інтенсивною за таку у гемаглютиніну (рис. 6.2). Так, українські ізоляти розташувались у двох генетичних групах. Без змін залишилася група A/Hong Kong/5659/2012-подібних вірусів, в якій розташувалися виділені нами ізоляти A/Ukraine/3/13 і A/Ukraine/523/13. А інші 8 вірусів за нейрамінідазою були подібні до референс-штаму A/St.Peterburg/100/2011. Основні зміни полягали у об'єднанні ізолятів з 1 і 3 груп, і відокремленні референс-штаму A/St.Peterburg/27/2011 до другої групи [132].

Серед амінокислотних заміщень у нейрамінідазі варто виділити Y351F, яке спостерігалось у всіх ізолятів окрім вакцинного штаму A/California/07/2009, та V106I і N248D — окрім A/California/07/2009 і A/Bayern/69/2009. У штамі двох груп, сформованих за участі виділених нами штамів, спостерігалися заміщення V241I і N369K.

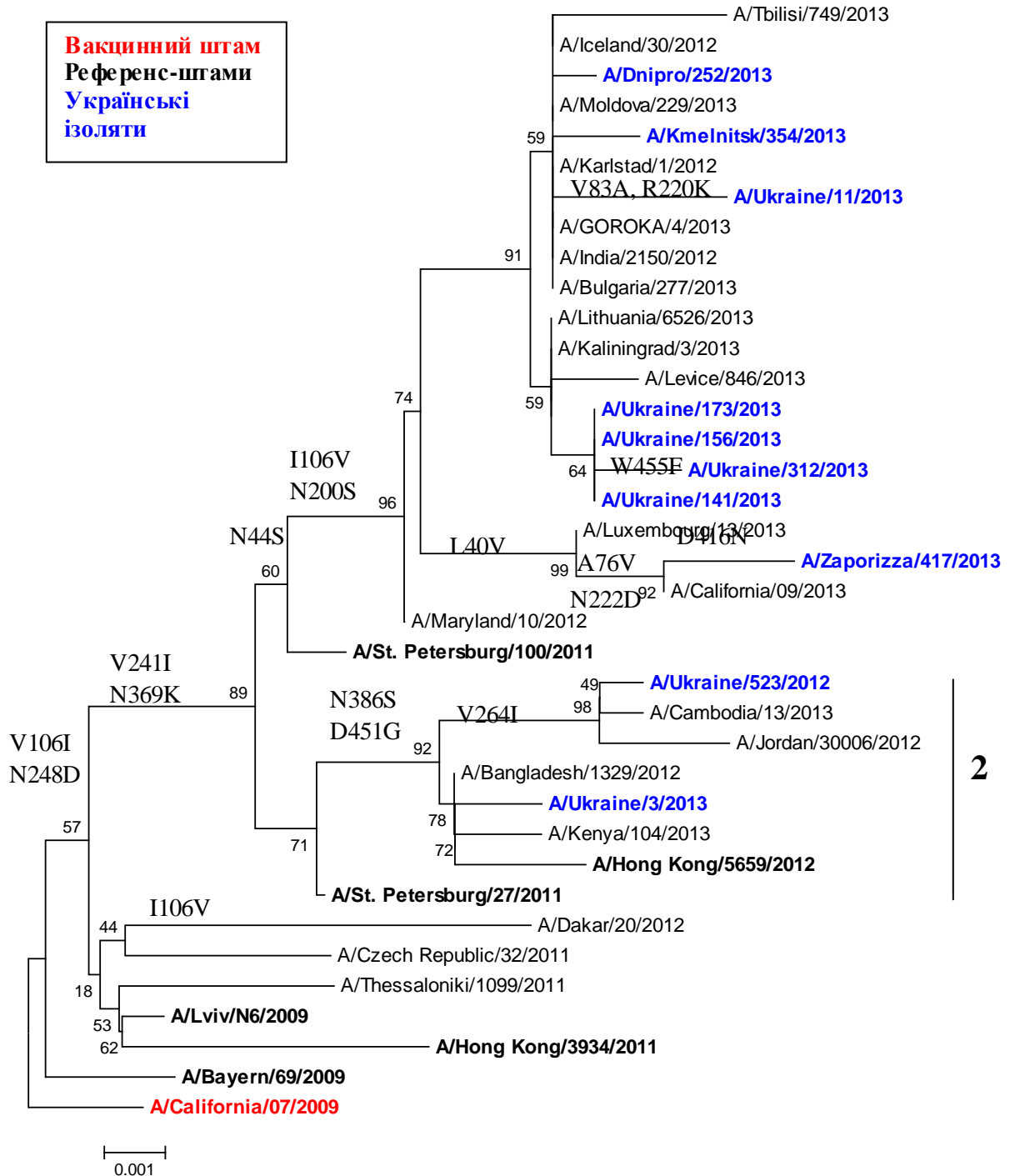


Рисунок 5.2. Філогенетичне дерево вірусів грипу A(H1N1)pdm09 сезону 2012-2013 за нуклеотидними послідовностями NA, побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

1 Група — A/St.Peterburg/100/2011-подібні. Ізоляти групи характеризувались амінокислотним заміщенням N44S, а крім референс-штаму — I106V і N200S. Група сформувала два розгалуження. Перше — із

заміщеннями L40V, A76V і N222D, куди увійшов штам із Запоріжжя, який показав додаткове заміщення D416N. Друге — всі ізоляти, що за гемаглютиніном знаходились у першій групі. Серед цих ізолятів у штаму A/Ukraine/11/13 виявлено заміщення V83A і R220K, а в A/Ukraine/312/13 — W455F.

2 Група — A/Hong Kong/5659/2012-подібні, які набули заміщення N386S і D451G. А ізоляти з Камбоджі, Йорданії і A/Ukraine/523/13 набули додаткового заміщення V264I (рис. 5.2).

Таким чином, ізоляти пандемічних вірусів грипу A(H1N1)pdm сезону 2012-2013 виділені в Україні, хоч і були генетично подібними до вакцинного та референс-штамів на рівні 97%, накопичили поодинокі генетичні заміни, які розділили їх на філогенетичних деревах у різних групах.

Аналіз пандемічних вірусів грипу A(H1N1)pdm09 сезону 2013-2014 років.

Аналіз генетичних змін пандемічних вірусів проводили за генами поверхневих білків гемаглютиніну (HA) та нейрамінідази (NA). Для філогенетичного аналізу був взятий єдиний секвенований в умовах дозорного епідагляду за грипом ізолят A/Ukraine/28/2014. За допомогою бласт-аналізу були відібрані послідовності подібних вірусів з інших країн, включаючи вакцинний та референс-штами з ресурсу, присвяченого вірусам грипу GISAID [134].

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютиніни (HA)

За результатами філогенетичного аналізу генів гемаглютиніну було виявлено, що всі ізоляти, виділені в різних країнах світу в сезоні 2013 - 2014 рр. підтипу A(H1N1)pdm09, були генетично подібними до референс-штаму A/South Africa/3626/2013 (рис. 3.1), а також зберегли подібність до вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) на рівні 96%. Серед

пандемічних вірусів грипу прослідковується низька інтенсивність еволюційних змін від їх появи у 2009 року.

Усі обрані для аналізу послідовності показали амінокислотні заміщення P83S і I321V в гемаглютиніні, крім вакцинного штаму A/California/07/2009, а також S203T — крім A/Bayern/69/2009.

Заміщення E347K було виявлено на рівні штаму A/Astrakhan/1/2011 (рис. 6.3), а S451N і S185T — у виділених пізніше ізолятів. Ізоляти, розташовані на філогенетичному дереві від A/Hong Kong/5659/2012 і вище набули заміщення D97N, яке збереглося і у ізолятів поточного сезону.

Віруси сезону 2013 - 2014 років показали заміщення K283E і E499K, а частина з них також K163Q і A256T, які були виявлені у вірусів сезону 2012 - 2013 років розташовані на філогенетичному дереві від A/Hong Kong/5659/2012 і вище набули заміщення D97N, яке збереглося і у ізолятів поточного сезону.

Щодо досліджуваного штаму A/Ukraine/28/2014, то у нього було виявлено унікальне заміщення I510V (ізолейцин замінювався на валін), а також разом зі штамом A/Lisboa/4/2014 - заміщення T474M (треонін замінювався на метіонін). У штаму A/Paris/2496/2013 треонін у положенні 474 замінювався на іншу амінокислоту - аланін. Крім того, у останнього ізоляту спостерігалися додаткові заміщення A186T, R205K і G482E.

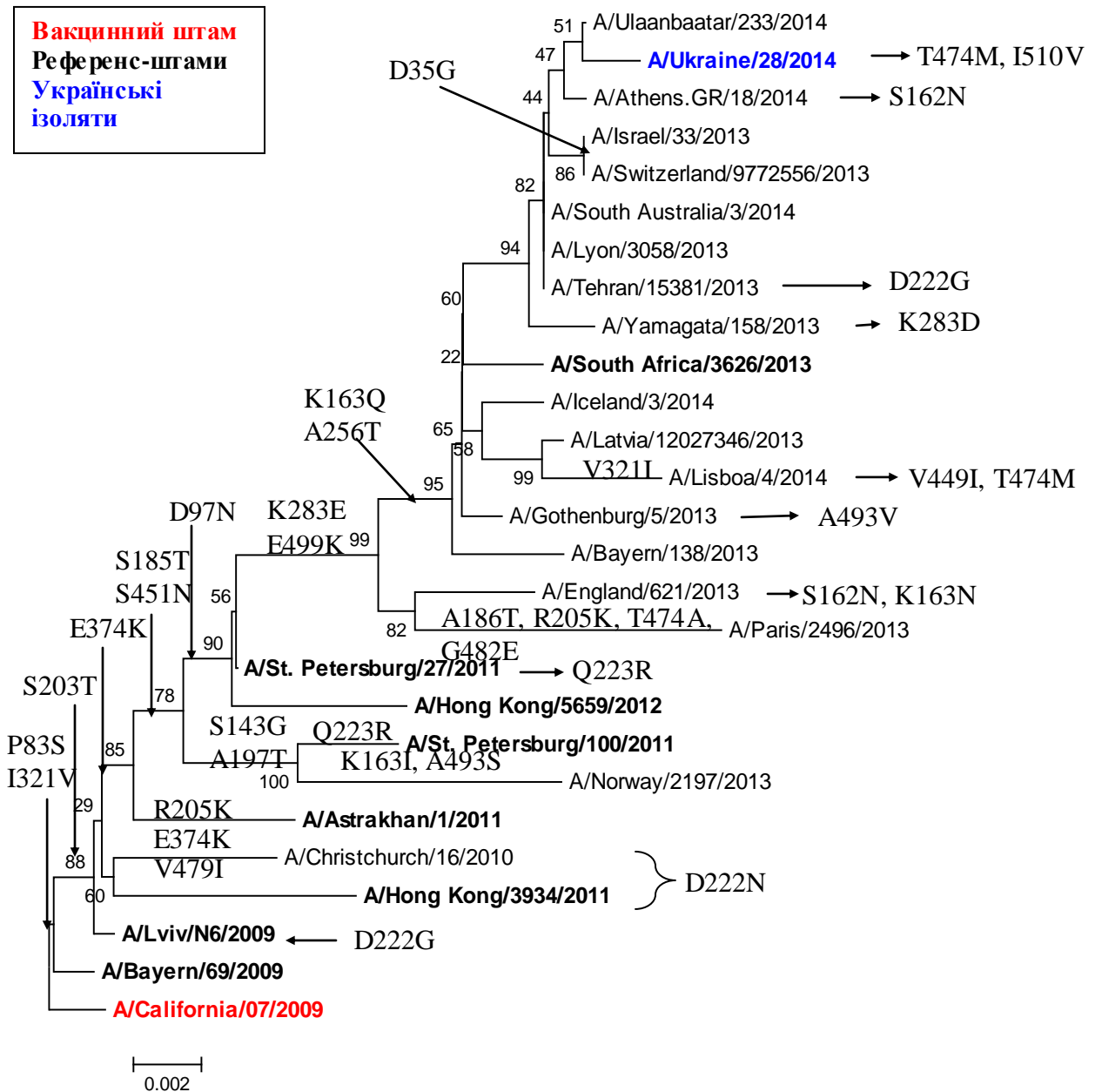


Рисунок 5.3. Філогенетичне дерево вірусів грипу A(H1N1)pdm09 сезону 2013 - 2014 за нуклеотидними послідовностями НА, побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Мутація D222G, з якою асоціюють тяжкий перебіг грипозного захворювання [135], в досліджуваному сезоні була виявлена у ізоляту A/Tehran/15381/2013. Раніше така мутація була знайдена у групи вірусів, виділених у Львові і Тернополі в сезоні 2009 – 2010 років [136].

Серед поодиноких заміщень, які ми виявили, варто виділити:

- S162N, K163N — у A/England/621/2013;
- A493V — у A/Göteborg/5/2013;
- V321I, V449I, T474M — у A/Lisboa/4/2014;
- K283D — у A/Yamagata/158/2013;
- D35G — у A/Israel/33/2013 I
A/Switzerland/9772556/2013;
- S162N — у A/Athens.GR/18/2014.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

При аналізі послідовностей нейрамінідази найбільша генетична подібність ізолятів сезону 2013 - 2014 років була виявлена до референс-штаму A/South Africa/3626/2013. Результати філогенетичного аналізу, подані на рисунку 5.4, показують що, мінливість генів нейрамінідази знаходилась на такому високому рівні, як і в гемаглютиніну.

У всіх відібраних для аналізу послідовностях, крім вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) і референс-штаму A/Bayern/69/2009, було присутнє заміщення в нейрамінідазі N248D. Мутація V106I, яка з'явилась ще у 2009 році, у ізолятів сезону 2013 – 2014 років ревертувала до дикого типу – I106V, як у A/California/07/2009 і A/Bayern/69/2009.

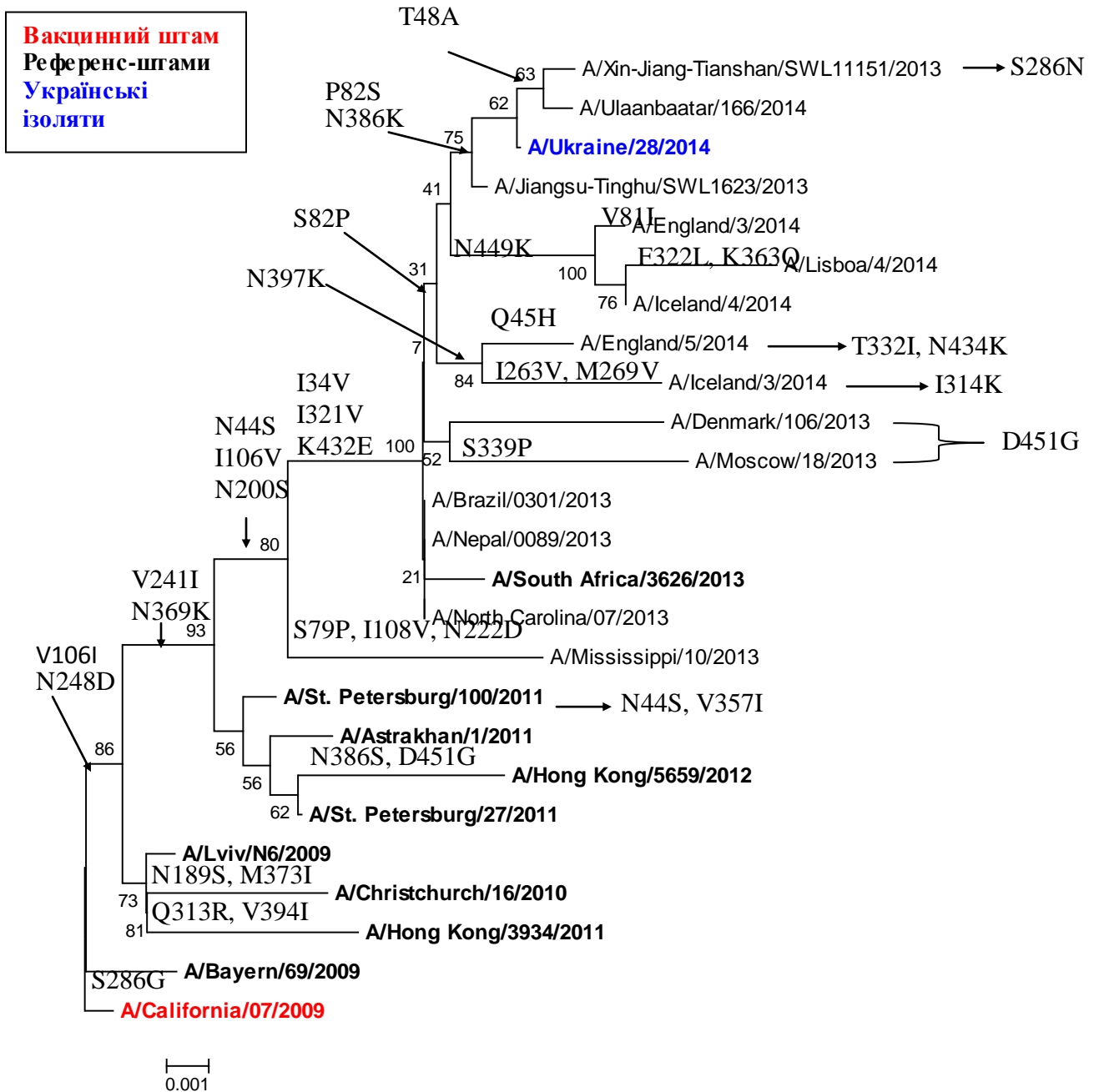


Рис. 5.4. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н1N1)рdm09 сезону 2013-2014 за нуклеотидними послідовностями NA, побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Усі ізоляти на філогенетичному дереві, починаючи з A/St. Petersburg/27/2011 і вище, набули заміщення V241I та N369K, а група ізолятів сезону 2013 - 2014 років від штаму A/Mississippi/10/2013, куди входить й український ізолят A/Ukraine/28/2014, набула заміщень N44S і N200S.

Привертає увагу ще одна реверсія: так у ізолятів A/Iceland/3/2014 і вище з'являється мутація S82P.

У ізолятів сезону 2013-2014, крім A/Mississippi/10/2013, утворилися три нові заміщення I34V, I321V і K432E, які не зустрічалися у вірусів сезону 2012-13 років [132]. Заміщення T48A прослідковується в ізолятах, розташованих на філогенетичному дереві вище штаму A/Ukraine/28/2014, а саме в A/Xin-Jiang-Tianshan/SWL11151/2013 і A/Ulaanbaatar/166/2014.

На відміну від послідовності гену гемаглютиніну в послідовності гену нейрамінідази досліджувального штаму A/Ukraine/28/2014 унікальних заміщень виявлено не було.

Серед інших мутацій у штамів поточного сезону варто виділити:

- S286N – у A/Xin -Jiang-Tianshan/SWL11151/2013, тоді як раніше у A/Bayern/69/2009 було виявлене заміщення S286G;
- V81I – у A/England/3/2014;
- F322L, K363Q – у A/Lisboa/4/2014;
- Q45H, T332I, N434K – у A/England/5/2014;
- I263V, M269V – у A/Iceland/3/2014;
- S339P – у A/Moscow/18/2013;
- D451G – у A/Moscow/18/2013, A/Denmark/106/2013;
- S79P, I108V, N222D – у A/Mississippi/10/2013.

Таким чином, мінливість пандемічних вірусів грипу у сезоні 2013-2014 років залишається на такому ж низькому рівні, як у попередньому 2012 – 2013. Низька мінливість ізолятів поточної епідемії зменшує ймовірність появи нових варіантів, які б кардинально різнилися від вакцинного штаму.

Аналіз пандемічних вірусів грипу А(Н1N1)pdm09 сезону 2014-2015 років

Аналіз генетичних змін пандемічних вірусів проводили за генами поверхневих білків гемаглютиніну (НА) та нейрамінідази (НА). Для філогенетичного аналізу були відібрані сиквеновані ізоляти вірусів грипу з дозорних центрів країни в умовах дозорного епіднагляду за грипом:

A/Ukraine/399/2015, A/Ukraine/433/2015, A/Ukraine/427/2015, A/Ukraine/160/2015, A/Dnipro/454/2015, A/Odessa/232/2015., штамів з рутинного дозору: A/Ukraine/6459/2015, A/Ukraine/6395/2015, A/Ukraine/6392/2015., вакцинного штаму A/California/07/2009 референс-штамів: A/South Africa/3626/2013, A/St.Petersburg/27/2011, A/Hong Kong/5659/2012, A/St.Petersburg/100/2011, A/Astrakhan/1/2011, A/Lviv/06/2009, A/HongKong/3934/2011, A/Christchurch/16/2010, A/Bayern/69/2009 та ізолятів з усього світу.

За допомогою бласт-аналізу були відібрані послідовності подібних вірусів з інших країн, включаючи вакцинний та референс-штами з ресурсу, присвяченого вірусам грипу GISAID [134].

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютиніну (НА)

За результатами філогенетичного аналізу генів гемаглютиніну було виявлено, що всі ізоляти сезону 2014-2015 років були генетично подібними до референс-штаму A/South Africa/3626/2013 (рис.5.5), а також зберегли подібність до вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) на рівні 96%. Серед пандемічних вірусів грипу зберігається тенденція низької інтенсивності еволюційних змін від їх появи у 2009 році.

Усі відібрані для аналізу послідовності крім вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) показали у гемаглютиніні амінокислотні заміщення P83S і I321V, а також S203T — крім A/Bayern/69/2009.

Заміщення E347K було виявлено на рівні штаму A/Astrakhan/1/2011 (рис.6.5), а S451N і S185T — у виділених пізніше ізолятів. Ізоляти,

розташовані на філогенетичному дереві від A/Hong Kong/5659/2012 і вище набули заміщення D97N, яке збереглось й у ізолятів поточного сезону. Схожа картина амінокислотних заміщень серед референс-штамів мала місце в минулому сезоні 2013-2014 років. Віруси сезону 2014-2015 рр. показали заміщення E499K, K283E і K163Q, а частина з них також V321I і A256T, які були виявлені частково й у вірусів сезонів 2012-2013 та 2013-2014 років.

Щодо досліджуваних українських штамів, то лише два з них мали заміщення: A/Dnipro /454/2015 – у якого було виявлено унікальне заміщення D94N (аспарагінова кислота замінювалася на аспарагін) та ізолят A/Ukraine/433/2015, де спостерігалось заміщення аргініну лізином в 205 положенні (R205K), а також з ізолятом A/Berlin/81/2014 - заміщення S84N (серин заміщувався на аспарагін).

Серед поодиноких заміщень, які ми виявили, варто виділити:

- M257V — у A/Ghana/Dili-0567/2014;
- T474M — у A/Norway/3237/2014;
- D168N — у A/Paris/2302/2014;
- K146R — у A/Latvia/12-020598/2014;
- K208R — у A/Denmark/51/2014.

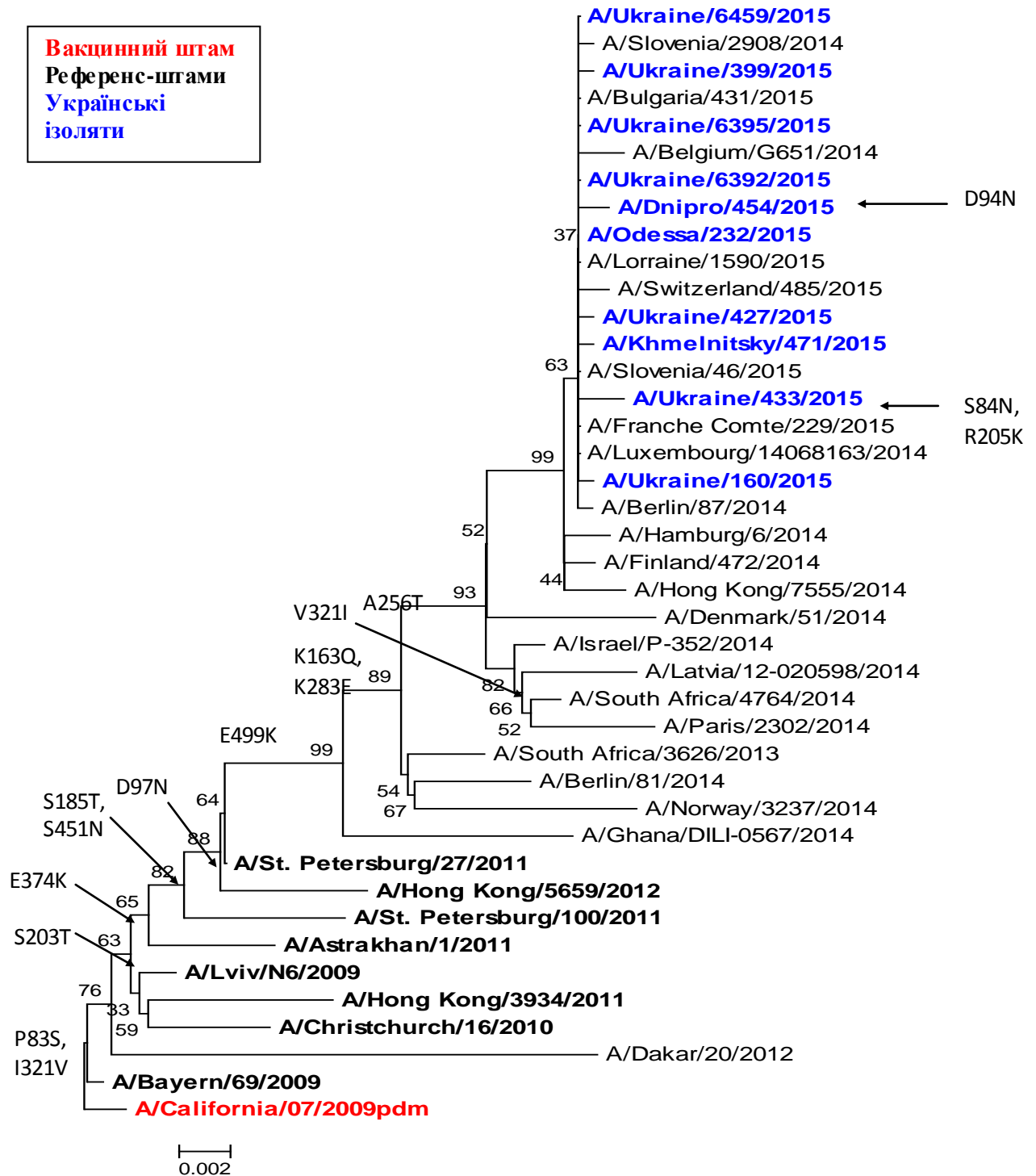


Рис. 5.5. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н1N1)09 сезону 2014-2015 за нуклеотидними послідовностями гемаглютиніну (НА), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

При аналізі послідовностей нейрамінідази найбільша генетична подібність ізолятів сезону 2014-2015 років була виявлена до референс-

штаму A/South Africa/3626/2013. Результати філогенетичного аналізу, подані на рисунку 5.6, показують вищу мінливість генів нейрамінідази, ніж як в гемаглютиніну.

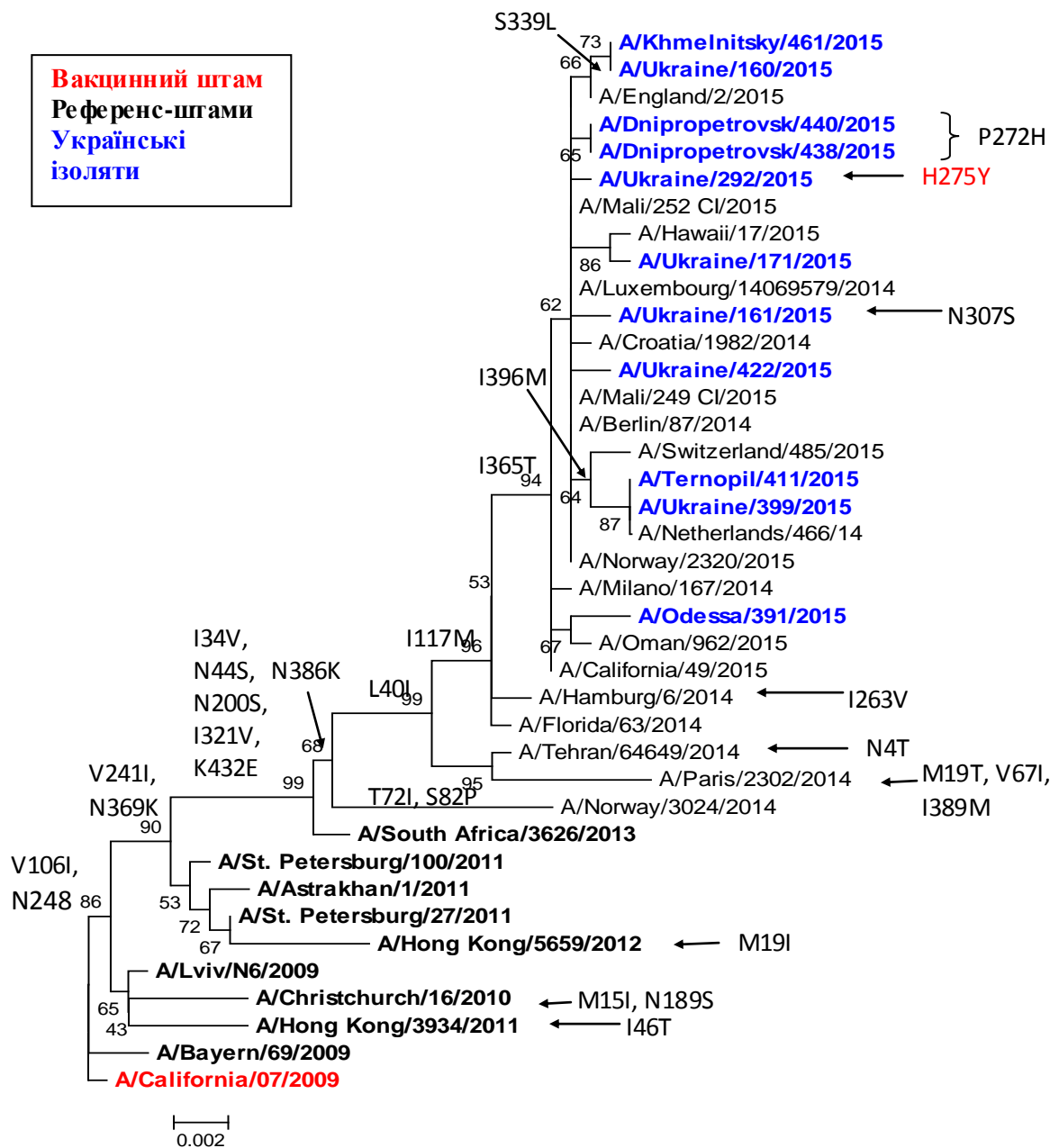


Рис. 5.6. Філогенетичне дерево вірусів грипу A(H1N1)pdm09 сезону 2014-2015 за нуклеотидними послідовностями гемаглютиніну (NA), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

У всіх взятих для аналізу послідовностях, крім вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) і референс - штаму A/Bayern/69/2009, було присутнє заміщення в нейрамінідазі N248D. Мутація V106I, яка з'явилась ще у 2009 році, у ізолятів сезону 2013-2014 ревертувала до дикого типу – I106V, як у A/California/07/2009 і A/Bayern/69/2009. В усіх ізолятах, які

розміщені на філогенетичному дереві, починаючи з A/St.Petersburg/27/2011 і вище, утворилися заміщення V241I та N369K, а група ізолятів сезону 2014 – 2015 років, починаючи від штаму A/South Africa/3626/2013, куди входять й українські ізоляти, набула заміщень I34V, N44S та N200S.

Ізоляти сезону 2014-2015 набули три заміщення I34V, I321V і K432E, які зустрічалися у вірусів сезону 2013-2014 років, але не зустрічалися у вірусів сезону 2012-2013 років. Група вірусів, що на дереві бере початок з A/Norway/3024/2014, має два заміщення L40I і N386K, останнє з яких зустрічалося в ізолятах минулого сезону. Всі українські ізоляти з ізолятами з інших країн мали заміщення I117M та I365M. Ізолейцин замістив метіонін (I396M) у двох українських ізолятів A/Ternopil/411/2015 та A/Ukraine/399/2015, що розмістилися поруч з ізолятом з Нідерландів і Швейцарії. Ще одне унікальне заміщення N307S у нейрамінідазі виявлено в українського ізоляту A/Ukraine/161/2015. Два ізоляти з Дніпропетровська селектували спільну мутацію P272H (пролін заміщувався на гістидин). Також точкові мутації мають ізоляти A/Ukraine/160/2015, разом з A/Khmelnytsky/461/2015 та A/England/02/2015 – S339L.

Український ізолят A/Ukraine/292/2015 набув унікальне точкове заміщення – H275Y, яке зумовлює резистентність вірусу грипу до озельтамівіру.

Серед інших мутацій у штамів поточного сезону спостерігались:

- I46T – у A/Hong Kong/3934/2011;
- M15I, N189S – у A/Christchurch/16/2010;
- M19I – у A/Hong Kong/5659/2012;
- T72I, S82P – у A/Norway/3024/2014;
- M19T, V67I, I389M – у A/Paris/2302/2014;
- I263V – у A/Hamburg/6/2014.

Таким чином, мінливість пандемічних вірусів грипу у сезоні 2014-2015 залишилась на низькому рівні, як і в попередніх 2012-2013 та 2013-2014 роках. Часті реверсії свідчать про ще не вичерпаний інфекційний потенціал «старих штамів». У одного з досліджуваних ізолятів відбулась селекція мутації резистентності до озельтамівіру H275Y у послідовності нейрамінідази. Низький рівень мутаційних змін в ізолятах поточної епідемії зберігає високу подібність пандемічних вірусів грипу до вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1), який залишився незмінним і його включено до складу вакцин на наступний епідемічний сезон 2015-2016 років.

Отже, філогенетичне порівняння циркулюючих в Україні у 2012-2015 роках вірусів грипу A(H1N1)pdm09 засвідчило їх несуттєві зміни за цей період спостереження.

5.2. Генетична характеристика сезонних вірусів грипу A(H3N2)

Аналіз вірусів грипу A(H3N2) за генами гемаглютиніну (HA) та нейрамінідази (NA) 2012-2013 роках

Для аналізу були взяті послідовності виділених нами ізолятів A/Dnipropetrovsk/361/13, A/Dnipropetrovsk/364/13, A/Dnipropetrovsk/390/13, A/Ukraine/275/13, A/Ukraine/288/13, A/Ukraine/316/13, A/Ukraine/387/13, A/Ukraine/391/13, A/Ukraine/466/13, A/Kmel'nitsk/350/13 і A/Kmel'nitsky/480/13, вакцинних штамів (A/Victoria/361/2011 і A/Texas/50/2012), референс-штамів (A/Perth/16/2009, A/Victoria/208/2009, A/Alabama/05/2010, A/Stockholm/18/2011, A/Iowa/19/2010 і A/Hawaii/22/2012) та ізоляти з усього світу. BLAST аналіз показав високу подібність ізолятів сезону 2012-2013 років між собою (96% і більше) [53].

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютиніну (HA)

Філогенетичне дерево, побудоване методом об'єднання найближчих сусідів (рис. 5.7) показало подібність виділених в умовах дозорного епіднагляду ізолятів до вакцинного штаму A/Victoria/361/2011 і розташування у субкластері 3С кластеру Victoria/208 [132].

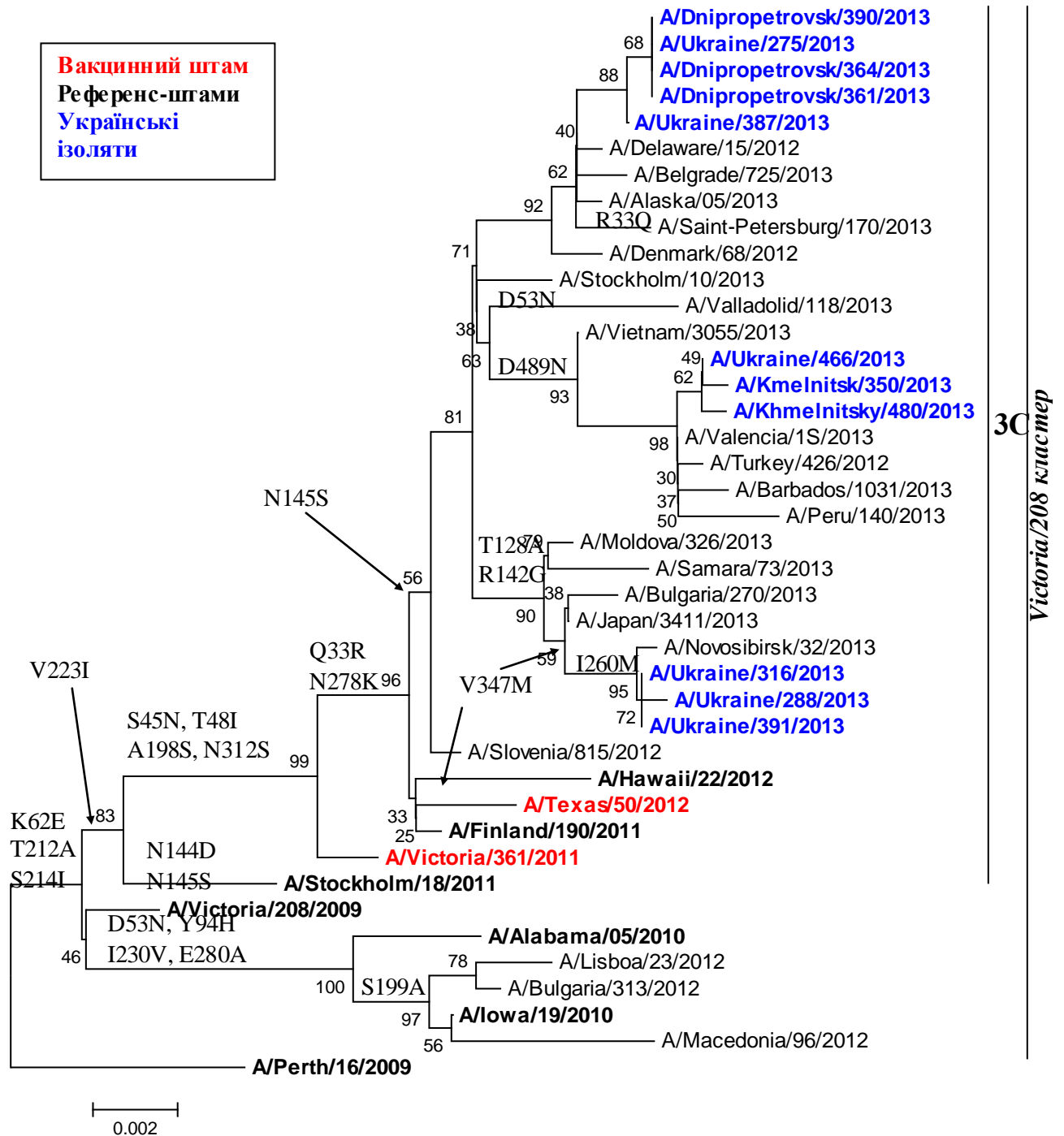


Рисунок 5.7. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н3N2) сезону 2012-2013 за нуклеотидними послідовностями гемаглютиніну (НА), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Ізоляти даного субкластеру беруть початок від штаму A/Perth/16/2009. Тут розмістився і штам A/Texas/50/2012, який є вакцинним на сезон 2013-2014 років для країн південної півкулі. У минулому епідсезоні тільки ізолят A/Ukraine/5381/2012 знаходився у субкластері 3С [137]. Така ж тенденція спостерігалась у світі (всі ізоляти 2013 року знаходились в згаданому субкластері). У межах субкластеру наші ізоляти знаходились у трьох генетичних групах, що підтвердило щонайменше триразове занесення епідемічних штамів до України (рис. 5.7).

Провівши аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваних вірусів, ми виявили, що всі ізоляти кластеру Victoria/208 продовжували селектувати мутації K62E, T212A і S214I [138] (рис. 5.3). Ізоляти субкластеру 3С набули заміщень Q33R і N278K, а разом із штамом A/Stockholm/18/2011 — S45N (набуття сайту глікозилювання), T48I, A198S і N312S. Віруси, виділені у 2013 році набули заміщення N145S [139].

Українські ізоляти розташувались у 3 генетичних групах субкластеру 3С:

- A/Ukraine/288/13, A/Ukraine/316/13 і A/Ukraine/391/13 разом з вірусами, виділеними у Росії, Молдові, Болгарії та Японії мали заміщення T128A (втрата сайту глікозилювання) і R142G. Додатково наші ізоляти, а також штами з Болгарії, Японії та Новосибірська набули заміщення V347M; і I260M зі штамом A/Novosibirsk/32/2013 (рис. 5.3).
- A/Ukraine/466/13, A/Khmel'nitsk/350/13 і A/Khmel'nitsky/480/13 разом з ізолятами з В'єтнаму, Валенсії, Туреччини, Барбадосу і Перу селектували заміщення D489N.
- A/Ukraine/275/13, A/Ukraine/387/13, A/Dnipropetrovsk/361/13, A/Dnipropetrovsk/364/13 і A/Dnipropetrovsk/390/13 розташувались у верхній частині філогенетичного дерева. Всі накопичені мутації були синонімічними і не призвели до зміни амінокислотної послідовності.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

Після проведення молекулярного аналізу ми отримали філогенетичне дерево, показане на рисунку 5.8.

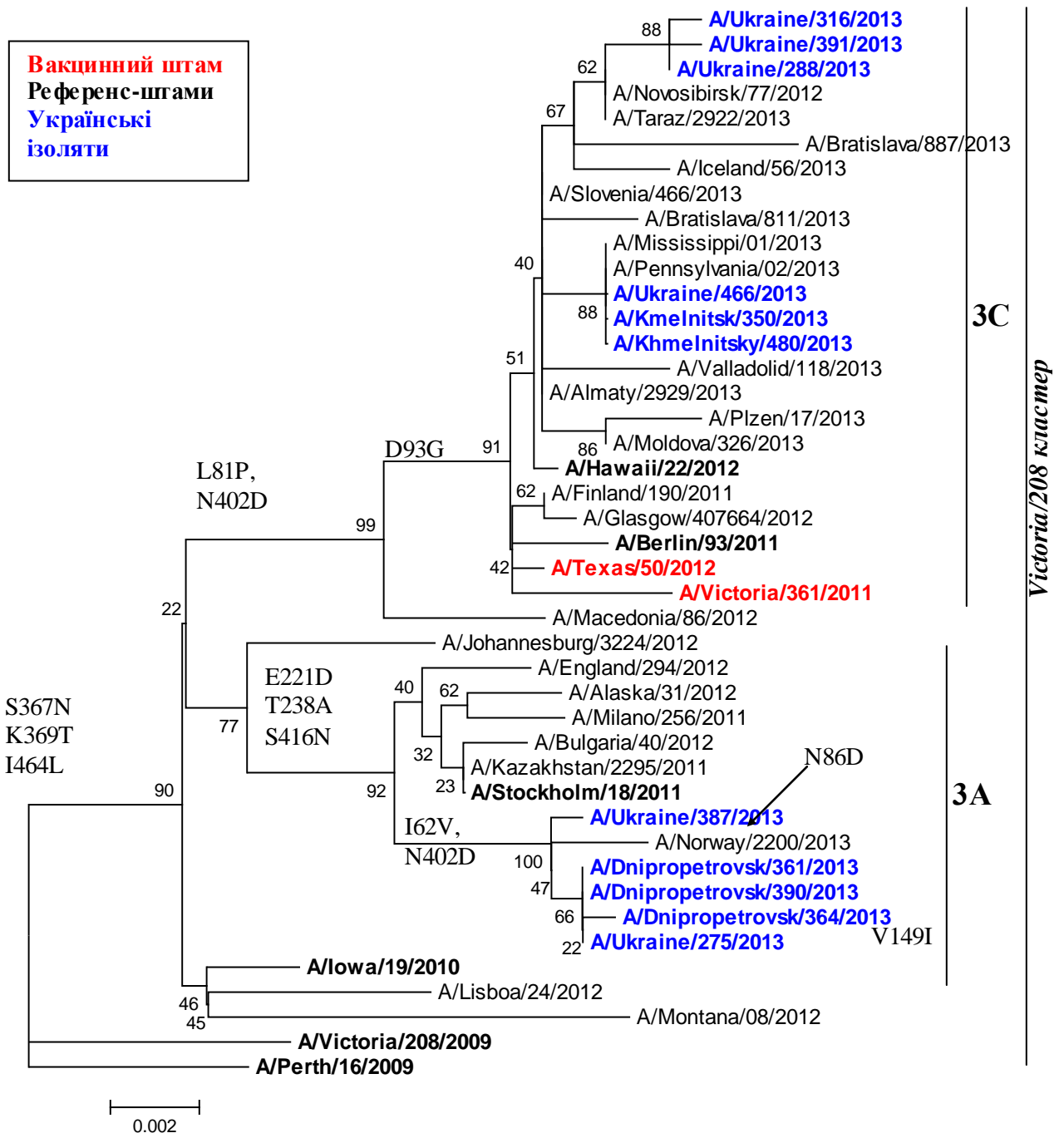


Рисунок 5.8. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н3N2) сезону 2012-2013 за нуклеотидними послідовностями нейрамінідази (NA), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій

Аналіз за генами нейрамінідази дав схожі результати з аналізом за генами гемаглютиніну, за винятком деяких розбіжностей. Усі виділені в епідемічний сезон 2012-2013 років віруси грипу А(Н3N2) знаходилися в межах кластеру Victoria/208 і були подібними до вакцинного штаму A/Victoria/361/2011. Більшість ізолятів, виділених у Києві і Хмельницькому, були подібними до референс-штамів A/Berlin/93/2011 і A/Hawaii/22/2012 і знаходились у субкластері 3С. Частина вірусів, виділених у Києві і Дніпропетровську, за послідовностями нейрамінідази належали до субкластеру 3А, тоді як за гемаглютиніном — до 3С. Ці ізоляти розташувались у нижній частині філогенетичного дерева і були подібними до референс-штаму A/Stockholm/18/2011.

У популяції вірусів грипу були відсутні заміни, пов'язані із резистентністю до інгібіторів нейрамінідази [140].

Амінокислотні заміщення були виявлені у меншій кількості порівняно з заміщеннями у гемаглютиніні. (рис. 5.8). Усі віруси поточного сезону закріпили мутації S367N, K369T і I464L. В українських ізолятів спостерігались наступні заміщення:

– У ізолятів субкластеру 3С — L81P, N402D і D93G заміщення. Українські штами знаходились у двох різних генетичних групах, але їхні нуклеотидні заміни виявились синонімічними.

– У субкластері 3А заміщень спостерігалось більше. Так всі ізоляти селектували E221D, T238A і S416N. Заміщення I62V і N402D були виявлені у вірусів, ізольованих у Києві, Дніпропетровську і штаму з Норвегії. Додатково штаму A/Dnipropetrovsk/390/2013 набув заміщення V149I, а A/Ukraine/275/2013 — N86D.

Таким чином, протягом періоду дослідження генетична мінливість гемаглютинінів вірусів грипу А(Н3N2), які були виділені в Україні, мала послідовний дрейфовий характер і співпадала з такою у світі.

Аналіз вірусів грипу А(Н3N2) за генами гемаглютиніну (НА) та нейрамінідази (НА) 2013-2014 років

У сезоні 2013 – 2014 років віруси грипу А(Н3N2) домінували в Україні. Велика кількість виділених нами і, відповідно, сиквенованих ізолятів дозволила провести детальний генетичний аналіз популяції циркулюючих в країні вірусів грипу А(Н3N2).

Для філогенетичного аналізу були взяті послідовності виділених нами ізолятів А/Ukraine/77/2014, А/Ukraine/218/2014, А/Ukraine/710/2013, А/Ukraine/728/2013, А/Dnipro/227/2014, А/Dnipro/229/2014, А/Dnipro/232/2014, А/Dnipro/234/2014, А/Dnipro/235/2014, А/Kharkov/201/2014, А/Kharkov/203/2014, А/Zhitomir/286/2014, А/Zhitomir/290/2014, штамів з рутинного дозору А/Ukraine/6004/2013, А/Ukraine/6161/2014, вакцинного штаму А/Texas/50/2012, референс-штамів А/Perth/16/2009, А/Victoria/361/2011, А/Stockholm/18/2011, А/Hong Kong/146/2013, А/Samara/73/2013 та ізолятів з усього світу, найбільш подібних до наших вірусів.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютиніну (НА)

Результатом філогенетичного аналізу за послідовностями гену гемаглютиніну є дендрограма, побудована методом об'єднання найближчих сусідів (рис.5.9).

Від штаму А/Perth/16/2009, який знаходиться внизу дерева, ізоляти відрізнялись рядом заміщень: К62Е, К144N, L183H, T212A, S214I. Причому мутація, за якої лізин у положенні 144 заміщується на аспарагін, надала новий сайт глікозилювання [141]. Незвичним було розташування ізоляту А/Israel/20/2013, який генетично виявився більш подібним до ізолятів ще 2009 р., набувши унікальних мутацій К2Е, N8D, D53N, Y94H, I230V, E280A, і зберігши у 223 положенні амінокислоту валін.

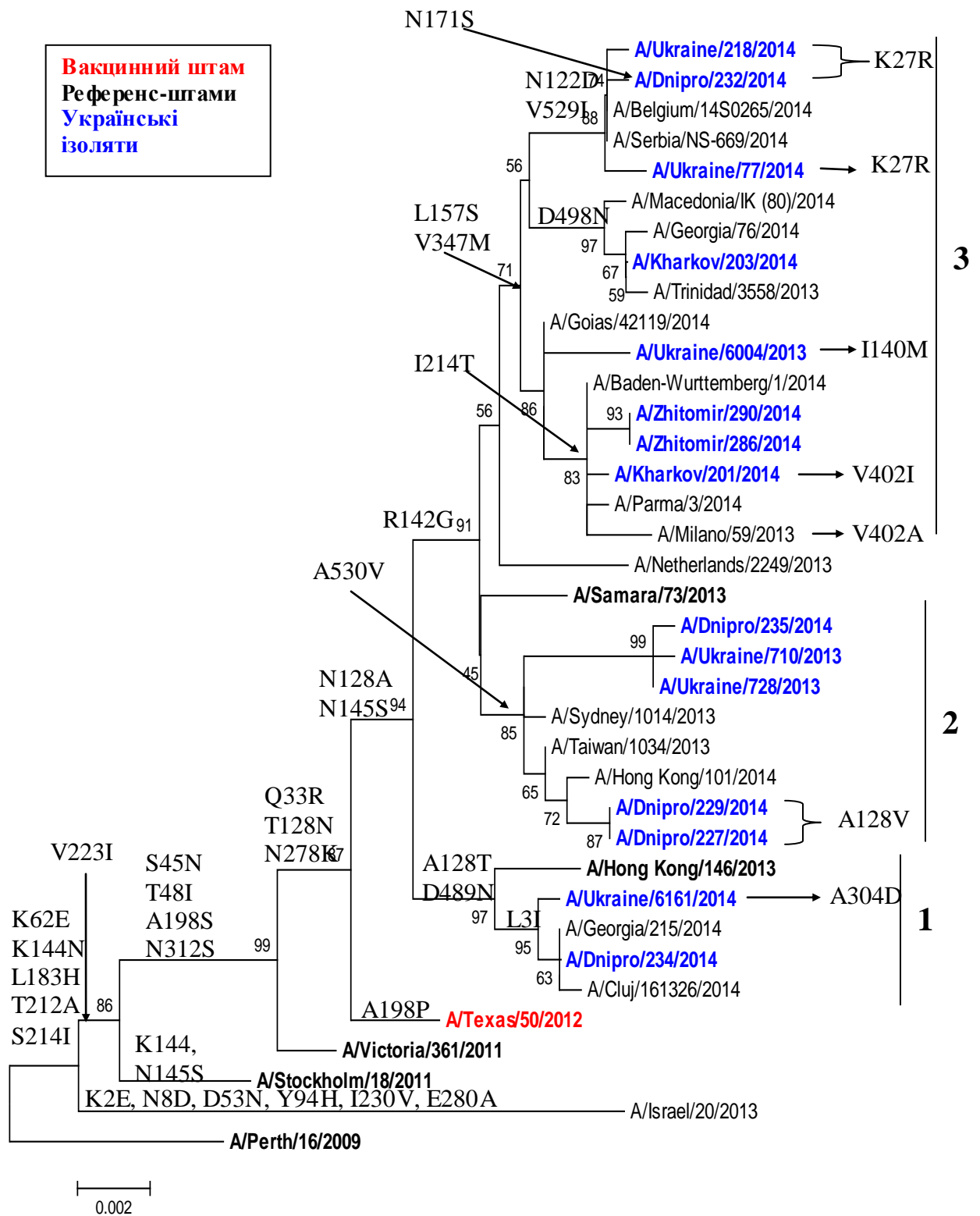


Рисунок 5.9. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н3N2) сезону 2013-2014 за нуклеотидними послідовностями гемаглютиніну (НА), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Усі досліджувані ізоляти сезону 2013 – 2014 років, як і в минулому епідсезоні, розташувались у субкластері 3С кластеру A/Victoria/208/2009 разом з вакцинним штамом A/Texas/50/2012 [139]. Однак вони набули нових амінокислотних змін, які дозволили виділити їх у три групи. Субкластер 3С з заміщеннями S45N, T48I, A198S і N312S, який на дендрограмі представлений ізолятами вище A/Stockholm/18/2011, був описаний раніше [142]. Заміщення S45N, за якого серин заміщується на аспарагін надав гемаглютиніну додатковий сайт глікозилювання [141].

Вакцинний штам A/Texas/50/2012 разом з ізолятами двох останніх сезонів селектував заміщення Q33R, T128N і N278K [139].

У вірусів сезону 2013 - 2014 років були виявлені заміщення N128S і N145S, причому останнє спостерігалось і раніше – у A/Stockholm/18/2011, однак у наступних ізолятів не закріпилась. (рис.5.9)

Детальна характеристика груп, де розташувались досліджувані ізоляти подана нижче.

1 - а група – віруси з заміщенням A128T і D489N. Група об'єднала ізоляти 2014 року і референс-штам A/Hong Kong/146/2013. Причому минулорічні штами набули також заміщення L3I. До групи увійшли українські ізоляти A/Dnipro/234/2014 і A/Ukraine/6161/2014, а останній показав унікальне заміщення A304D (аланін заміщується на аспарагінову кислоту) [143].

Друга і третя групи селектували спільне заміщення R142G і були генетично подібними до референс - штаму A/Samara/73/2013.

2 - а група – об'єднала ізоляти 2013 - 2014 років, які несли заміщення A530V. Сюди увійшли ізоляти з Дніпропетровська (A/Dnipro/227/2014, A/Dnipro/229/2014, A/Dnipro/235/2014) та Києва (A/Ukraine/710/2013, A/Ukraine/728/2013). У Дніпропетровських штамів №227 і №229 спостерігалось заміщення A128V, тоді як у вірусів першої групи у 128 положенні знаходилась амінокислота треонін (рис.6.9)

3 – я група – об'єднала ізоляти з мутаціями L157S (описана раніше у ізолятів поточного сезону з Іспанії [144]) і V347M, причому остання була виявлена раніше у наших ізолятів сезону 2012 – 2013 рр. Група містила, як віруси з різних регіонів України, так і штами з різних куточків світу. Ізоляти A/Zhitomir/286/2014, A/Zhitomir/290/2014 і A/Kharkov/201/2014 набули заміщення I214T (ізолейцин заміщувався на треонін). Найбільш подібними до них виявилися європейські штами з Мілану, Парми та Баден-Вуртемберга. У 3 групі був виявлений поліморфізм: штам з Харкова, в положенні 402 ніс амінокислоту ізолейцин, а у Мілану – А (аланін). Ізолят з рутинного дозору A/Ukraine/6004/2013 набув заміщення I140M (ізолейцин заміщувався на метіонін).

Заміщення D489N було знайдено в групі ізолятів 2012 - 2013 р. і збереглося у поточному сезоні. Його селектував штам A/Kharkov/203/2014, а також віруси з Македонії, Тринідаду та ізоляти 1 групи. П'ять Європейських ізолятів, включаючи A/Ukraine/218/2014 та A/Dnipro/232/2014, набули заміщень N122D (описане в Іспанських ізолятів [144]) , V529I і розташувались у верхній частині філогенетичного дерева. Також українські штами набули нового заміщення, за якого лізин у 27 положенні гемаглютиніну заміщувався на аргінін. A/Dnipro/232/2014 додатково селектував заміщення N171S (аспарагін заміщувався на серин).

Проаналізувавши послідовності генів гемаглютиніну українських ізолятів можна зробити висновок, що популяція циркулюючих в Україні вірусів грипу А(Н3N2) була надзвичайно гетерогенною, а штами заносились з різних географічних зон світу. Частина виділених нами ізолятів набула нових мутацій, які мають шанс закріпитися в наступних епідсезонах.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

Результат філогенетичного порівняння поданий на рисунку 5.10.

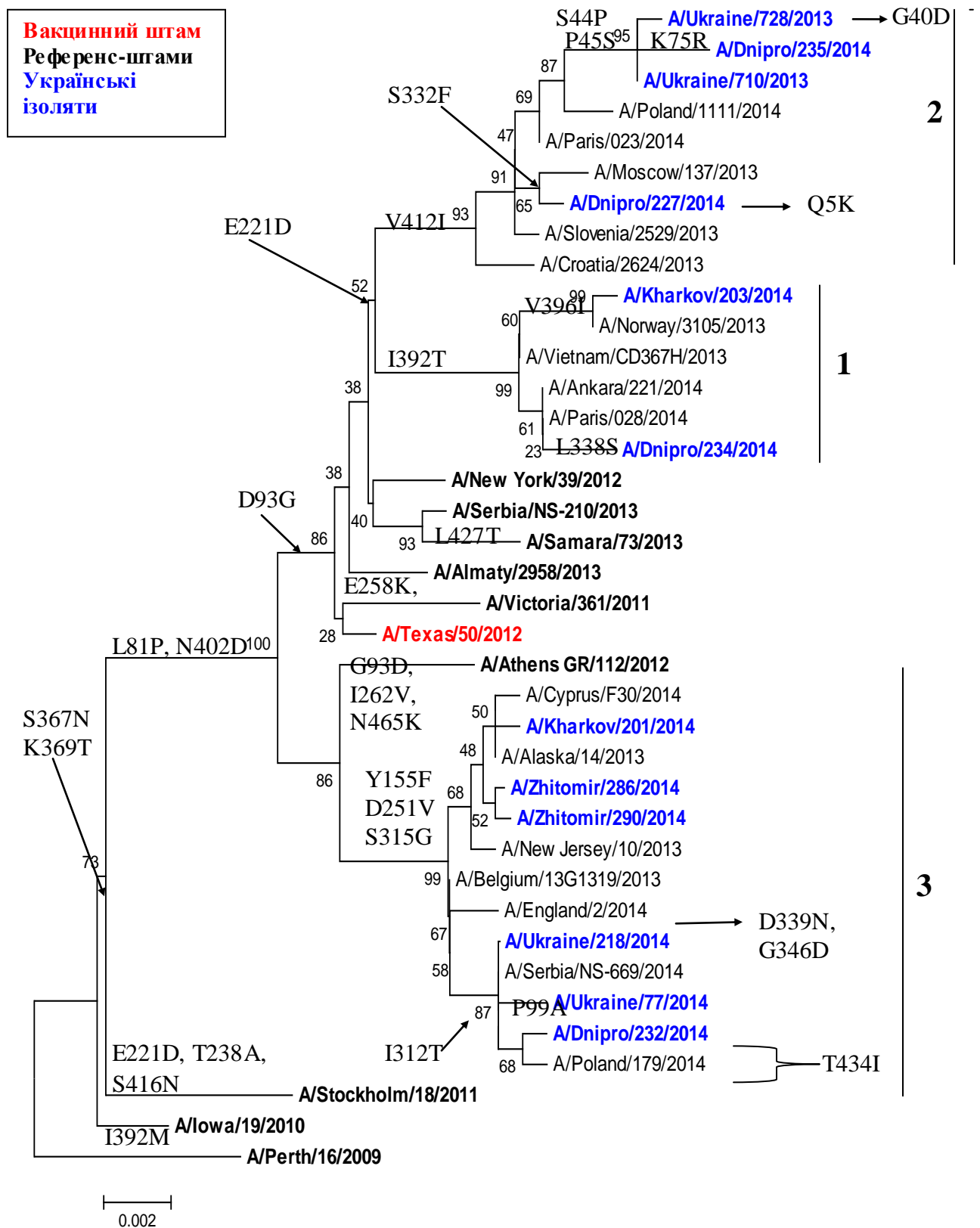


Рисунок 5.10. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н3N2) сезону 2013 - 2014 за нуклеотидними послідовностями гену нейрамінідази (NA), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Результати аналізу послідовностей гену нейрамінідази були тотожними аналізу гемаглютиніну. Усі виділені в епідемічний сезон 2013 - 2014 років віруси грипу А(Н3N2) знаходились в межах субкластеру 3С кластеру Victoria/208 і зберегли мутації S367N і K369T, характерні кластеру 3, а також мутації L81P і N402D (втрата сайту глікозилювання [145]), характерні субкластеру 3С [139].

Усі досліджувані ізоляти поточного сезону були генетично подібними до вакцинного штаму А/Texas/50/2012, але мали певні відмінності, які дозволили розділити їх на 3 генетичні групи. Групи 1 і 2 (рис.3.4) характеризувались спільним заміщенням D93G, яке спостерігалось і в ізолятів сезону 2012-13 рр. Також ці групи мали заміщення E221D, порівняно з раніше виділеними штамами [144].

1 – а група – віруси із заміщенням I392T. До групи увійшли наші штами А/Kharkov/203/2014, який з найближчим ізолятом з Норвегії селектував заміщення V396I (валін заміщувався на ізолейцин), та А/Dnipro/234/2014 з заміщенням L338S (лейцин заміщувався на серин). Найбільш подібними до Дніпропетровського ізоляту були штами з Турції і Франції (рис.6.10).

2 – а група – сформована з вірусів з заміщенням V412I, куди увійшли чотири українських ізоляти. Штам А/Dnipro/227/2014 набув також заміщення Q5K (глутамін заміщувався лізином). Найбільш подібним до нього виявився ізолят А/Moscow/137/2013, з яким наш ізолят мав спільне заміщення S332F (серин заміщувався на фенілаланін). Інші три ізоляти А/Ukraine/710/2013, А/Ukraine/728/2013 і А/Dnipro/235/2014 несли мутації S44P і P45S і, ймовірно, були результатом одиничного занесення до країни під час епідемії. А/Ukraine/728/2013 також селектував мутацію G40D (гліцин заміщувався аспарагіновою кислотою), а А/Dnipro/235/2014 – K75R (лізин заміщувався аргініном). Загалом, друга група хоч і виявилась чисельнішою за першу групу, була представлена виключно ізолятами з європейського регіону.

З – я група – найбільша, що підтверджує розташування в ній українських ізолятів з різних регіонів країни. Група виявилась більш подібною до референс – штаму A/Athens GR/112/2012 ніж до новіших референс – вірусів. Мутації Y155F, D251V і S315G є новими. Третя група дуже гетерогенна, включає штами з Аляски, США і більшості країн Європи. Найбільш подібними до штаму A/Kharkov/201/2014 виявились ізоляти з Кіпру та Аляски, а ізоляти A/Zhitomir/286/2014 і A/Zhitomir/290/2014 розташувались поряд на дереві. (рис.6.10). Можна впевнено стверджувати про багаторазовий перетин кордонів циркулюючих штамів навіть в межах невеликої групи штамів, описаної вище. Ізоляти A/Ukraine/77/2014, A/Dnipro/232/2014 та віруси з Польщі і Сербії набули заміщення I312T. Дніпропетровський і польський штами також мали мутацію T434I. Ізолят A/Kharkov/203/2014 при аналізі генів гемаглютиніну знаходився в третій групі, а при порівнянні генів нейрамінідази був подібний до вірусів з першої групи [143].

Загалом мінливість генів нейрамінідази була нижчою за таку в гемаглютиніну. Усі досліджувані ізоляти не несли мутацій резистентності до озелтамівіру.

Віруси грипу A(H3N2) сезону 2013 – 2014 років хоч і були генетично різноманітними, відносились до домінуючого у світі субкластеру 3С кластеру Victoria/208 і були подібними до вакцинного штаму A/Texas/50/2012 [144].

Аналіз вірусів грипу A(H3N2) за генами гемаглютиніну (HA) та нейрамінідази (NA) 2014-2015 років

Для філогенетичного аналізу були взяті послідовності виділених нами ізолятів A/Ukraine/165/2015, A/Ukraine/170/2015, A/Ukraine/374/2015, A/Ukraine/501/2015, A/Khmelnytsky/465/2015, A/Khmelnytsky/466/2015, A/Khmelnytsky/468/2015, A/Khmelnytsky/469/2015, штамів з рутинного

дозору A/Ukraine/6784/2015, A/Ukraine/6809/2015, вакцинних штамів A/Texas/50/2012 та A/Switzerland/9715293/2013, референс-штамів A/Perth/16/2009, A/Victoria/361/2011, A/Stockholm/6/2014, A/HongKong/146/2013, A/Samara/73/2013, A/South Africa/4655/2013, A/HongKong/5738/2014, A/Norway/466/2014 та ізолятів з усього світу, найбільш подібних до наших вірусів.

У сезоні 2014-2015 до складу вакцини ввійшов новий штам - A/Switzerland/9715293/2013 [146].

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютиніну (HA)

Результатом філогенетичного аналізу послідовностей гену гемаглютиніну є дендрограма, побудована методом об'єднання найближчих сусідів (рис.5.11).

Усі досліджувані ізоляти сезону 2014-2015 років, як і в минулому епідсезоні, розташувались у субкластері 3С кластеру A/Victoria/208/2009 разом з вакцинним штамом A/Texas/50/2012. Однак вони набули нових амінокислотних змін, які дозволили виділити їх у три групи - 3С.2а, 3С.3а, 3С.3б. Більшість українських ізолятів належали до групи 3С.2а, представники якої характеризуються нездатністю зв'язувати еритроцити морської свинки. Вакцинний штам A/Texas/50/2012 разом з ізолятами двох останніх сезонів селектував заміщення Q33R і N278K .

Віруси в порівнянні з референс-штамом A/Perth/16/2009, який знаходиться внизу дерева, набули амінокислотних замін: K62E, K144N, L183H, T212A, S214I. У результаті заміни лізину на аспарагін у положенні 144, виник новий сайт глікозилювання [141].

Субкластер 3С з заміщеннями S45N, T48I, A198S і N312S, який на дендрограмі представлений ізолятами вище A/Stockholm/18/2011, був описаний раніше [142]. Заміщення S45N, за якого серин заміщується на аспарагін надав гемаглютиніну додатковий сайт глікозилювання [141].

Детальна характеристика груп, де розташувались досліджувані ізоляти подана нижче.

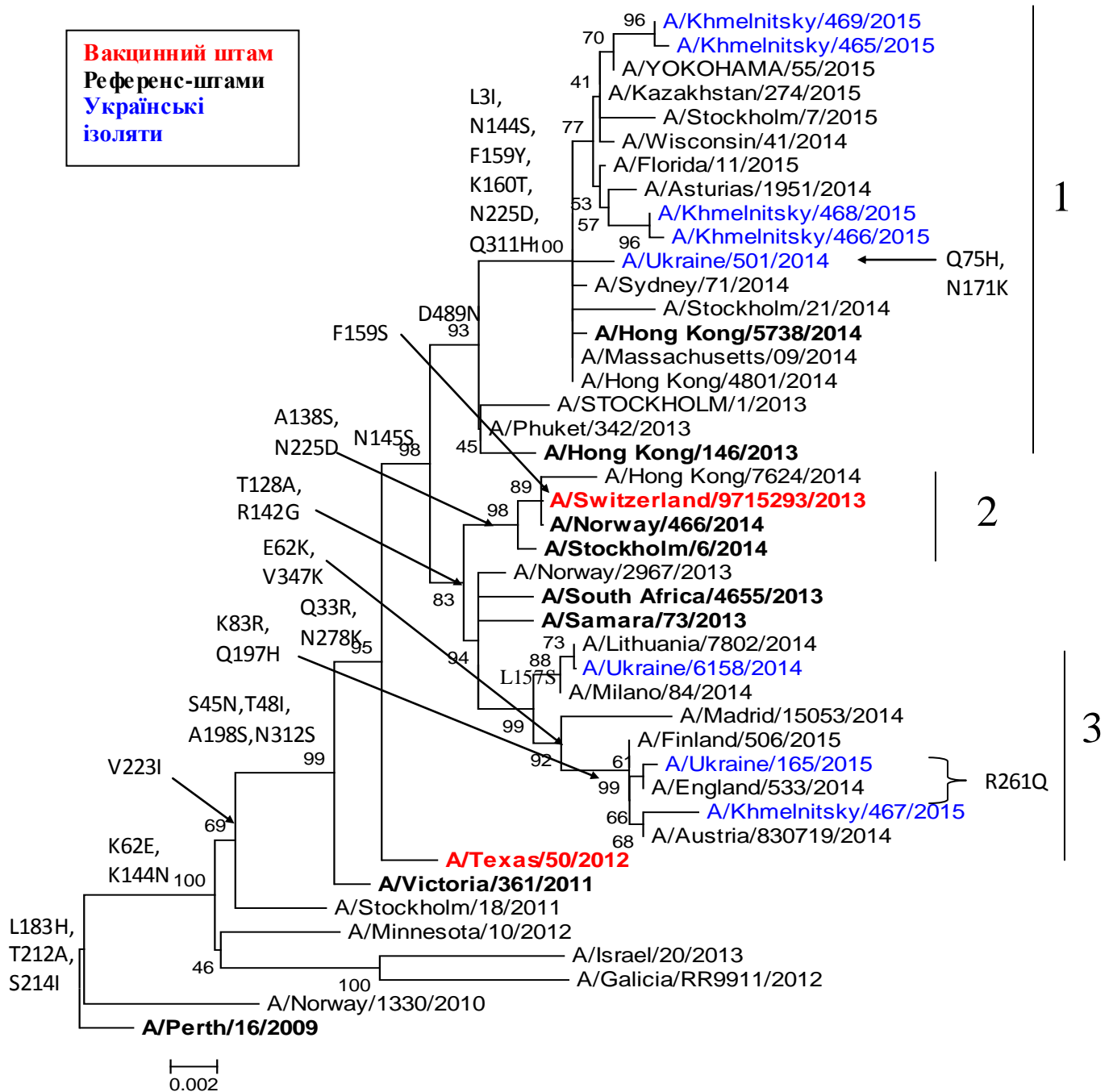


Рис. 5.11. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н3N2) сезону 2014-2015 за нуклеотидними послідовностями гемаглютиніну (НА), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

1 група – найчисельніша, куди увійшли віруси з заміщенням L3I, N144S. Ці мутації призвели до втрати сайту глікозилювання в положенні 3

та 144. Мутації F159Y та K160T, навпаки спричинили набуття нових сайтів глікозилювання в положеннях 159 та 160. А також N225D (аспарагін заміщується на аспарагінову кислоту) і Q311H (глутамін заміщується на гістидин). Група об'єднала ізоляти 2014 та 2015 років і референс-штами A/Hong Kong/146/2013 та A/Hong Kong/5738/2014. До групи увійшли 5 українських ізолятів – A/Khmelnytsky/469/2015, A/Khmelnytsky/465/2015, A/Khmelnytsky/468/2015, A/Khmelnytsky/466/2015 та A/Ukraine/501/2014, останній з яких показав унікальне заміщення Q75H (глутамін заміщується на гістидин). Ізоляти з Хмельницького №466 та №468 набули спільного заміщення D53N (аспарагінова кислота заміщується на аспарагін).

Друга і третя групи мали спільне заміщення R142G і були генетично подібними до референс - штаму A/Samara/73/2013.

2 група – об'єднала ізоляти 2014-15 рр., які мали заміщення A138S та N225D. Сюди увійшов вакцинний штам A/Switzerland/9715293/2013, який разом з референс-штамом A/Norway/466/2014 та штамом з Гонконгу (№7624) селектували унікальне заміщення F159S (фенілаланін заміщується на серин). Українські ізоляти до цієї групи не увійшли.

3 група – об'єднала ізоляти з мутацією L157S (описана раніше у ізолятів поточного сезону з Іспанії [144]). Група містила, як віруси з різних регіонів України, так і штами з різних куточків світу. Українські ізоляти A/Ukraine/165/2015 і A/Khmelnytsky/467/2015 разом з ізолятами з Австрії, Англії та Фінляндії набули заміщення K83R, Q197H. А разом з ізолятом з Мадриду (A/Madrid/15053/2014) ці ізоляти мали мутації E62K (глутамінова кислота заміщується на лізин, що призвело до втрати сайту глікозилювання) та V347K (валін заміщується на лізин). Унікальне заміщення R261Q (аргінін заміщується на глутамін) набув ізолят A/Ukraine/165/2015 та ізолят A/England/533/2014.

Заміщення D489N було знайдено в групі ізолятів 2012-13 років і збереглося у поточному сезоні. Це заміщення утворилося в штамі

A/Ukraine/501/2014, а також віруси з Стокгольму і Флориди та ізоляти 1 групи.

Проаналізувавши послідовності генів гемаглютиніну українських ізолятів можна зробити висновок, що популяція циркулюючих в Україні вірусів грипу A(H3N2) була надзвичайно гетерогенною, а штами заносились з різних географічних зон світу. Превалювали ізоляти першої групи. Частина виділених нами ізолятів набула нових мутацій, які мають шанс закріпитися в наступних епідсезонах.

Філогенетичне порівняння послідовності гену нейрамінідази (NA)

У результаті філогенетичного аналізу послідовностей гену нейрамінідази була побудована дендрограма, методом об'єднання найближчих сусідів (рис.5.12).

Усі виділені в епідемічний сезон 2014-2015 років віруси грипу A(H3N2) знаходились в межах субкластеру 3С кластеру Victoria/208 і зберегли мутації S367N і K369T, характерні кластеру 3, а також мутації L81P і N402D (втрата сайту глікозилювання [145]), характерні субкластеру 3С (рис.6.12).

За результатом філогенетичного аналізу генів нейрамінідази встановлено, що незначна частина досліджуваних ізолятів поточного сезону з інших країн були генетично подібними до вакцинного штаму A/Texas/50/2012, але вони характеризувались спільним заміщенням D93G, яке спостерігалось і в ізолятах сезону 2012-2013 і 2013-2014 років. Найбільш численна група ізолятів, виділених в різних куточках світу, в тому числі й в Україні, розмістилась в субкластері 3С.2 разом з новим вакцинним штамом A/Switzerland/9715293/2013, до якого мають високій ступінь подібності - до 75% [53].

увійшли наші штами A/Ukraine/374/2015 і A/Ukraine/501/2014. A/Ukraine/374/2015 з найближче розміщеними до нього ізолятами з Англії та Мадриду селектував заміщення I30V, I77T, I392M, L466F і мав точкову мутацію F37L (фенілаланін заміщувався на лейцин). Штам A/Ukraine/501/2014 мав заміщення A82S (аланін заміщувався на серин). Найбільш подібними до цього ізоляту був референс-штам A/HongKong/5738/2014 та штами з Аляски та Парижу. Також до цієї групи увійшов вакцинний штам A/Switzerland/9715293/2013, що говорить про його подібність до українських ізолятів.

2 група – найбільша, на філогенетичному дереві видно розташування семи українських ізолятів з різних регіонів країни. Група сформована вірусами з заміщеннями T267K та I380V. Штами A/Khmelnytsky/465/2015 та A/Khmelnytsky/469/2015 були найбільш подібними до ізоляту A/IBARAKI/63/2014, з яким мали спільне заміщення K249E. Ізолят A/Ukraine/170/2015 мав найбільшу схожість до ізоляту A/Navarra/790/2015 та спільне заміщення V396I (валін заміщувався на ізолейцин). У цю групу увійшли ще чотири українські ізоляти – A/Ukraine/6784/2015, A/Ukraine/6809/2015, A/Khmelnytsky/466/2015 та A/Khmelnytsky/468/2015, що мали найбільшу подібність до ізоляту A/Jordan/30021/2015.

3 група – мала характерну мутацію M51V. До цієї групи увійшов один український ізолят A/Ukraine/165/2015. Найбільш подібними до нього були штами з Стокгольму та Англії, які набули заміщення V143G, V263I, T434N. Також у штамі A/Ukraine/165/2015 та A/England/533/2014 виявили спільне точкове заміщення I392M (ізолейцин заміщувався на метіонін).

Ізоляти A/Khmelnytsky (№ 465, 466, 468, 469) при аналізі генів гемаглютиніну знаходились в першій групі, а при порівнянні генів нейрамінідази були подібні до вірусів з другої групи.

Загалом мінливість генів нейрамінідази була нижчою за таку в гемаглютиніну. Жоден з досліджуваних ізолятів не ніс мутацій резистентності до озелтамівіру.

Віруси грипу А(Н3N2) сезону 2014-2015 хоч і були генетично різноманітними, знаходились у домінуючому в світі субкластері 3С кластеру Victoria/208 і були подібними до вакцинного штаму А/Texas/50/2012.

Отже, філогенетичне порівняння циркулюючих в Україні у 2012-2015 роках вірусів грипу засвідчило значні дрейфові зміни у популяції вірусів підтипу А(Н3N2).

Матеріали досліджень, викладені в цьому розділі, опубліковані [132,137,138,139,140,143,146,153].

РОЗДІЛ 6. ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ ТИПУ В, ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ ПРОТЯГОМ 2012-2015 РОКІВ

Віруси грипу типу В виділялись в усіх трьох досліджуваних епідемічних сезонах з 2012 по 2015 роки. Генетичний аналіз проводили по сегментах, що кодують поверхневі антигени: гемаглютинін (НА) та нейрамінідаза (НА) [147]. За літературними даними, протягом останніх 50 років віруси грипу типу В показують нижчий рівень мінливості ніж віруси А(Н3N2) [148,149]. Також, з кінця ХХ століття, у світі циркулює дві генетичні гілки вірусів грипу типу В: В/Victoria/2/87 та В/Yamagata/16/88.

У період з 2010 по 2012 роки штами вірусів грипу типу В розділились на декілька генетичних груп в середині кластеру В/Bangladesh/3333 (В/Yamagata – lineage) та В/Brisbane/60 (В/Victoria – lineage) в залежності від відповідних мутацій.

На території України циркуляція вірусів генетичної лінії В/Victoria, починаючи з сезону 2012-2013 років, не спостерігалася [150]. Циркулювали лише віруси лінії В/Yamagata.

6.1. Аналіз вірусів грипу В генетичної гілки В/Yamagata за генами гемаглютиніну (НА) та нейрамінідази (НА)

Генетична характеристика вірусів грипу типу В генетичної гілки В/Yamagata 2012-2013 років

Для філогенетичного аналізу були взяті послідовності генів гемаглютиніну та нейрамінідази виділених в Україні вірусів грипу В/Ukraine/272/13, В/Ukraine/385/13, В/Ukraine/406/13, В/Ukraine/474/13, В/Ukraine/484/13, В/Ukraine/5814/13, В/Ukraine/5816/13, В/Ukraine/5897/13, В/Ukraine/5904/13, В/Ukraine/5940/13, В/Khmelnytsky/524/13 та В/Dnipropetrovsk/367/13. Послідовності вакцинних штамів

V/Massachusetts/02/2012, V/Wisconsin/01/2010, референс-ізолятів та вірусів, ізолюваних по всьому світі, були взяті зі світової бази даних по грипу.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютинину (HA)

Філогенетичний аналіз, поданий на рисунку 7.1, показав, що виділені під час епідсезону 2012-2013 років ізоляти грипу V/ Yamagata розділились на два генетичні кластери: V/Wisconsin/01/2010 і V/Massachusetts/02/2012-подібні, які відповідають двом вакцинним штамам.

Ізоляти обох кластерів утворили амінокислотні заміщення K88R, D196N, S229G і E478D порівняно зі штамом V/Florida/4/06. Нижче детально проаналізовано кожен кластер.

Кластер V/Wisconsin/01/2010. Віруси даного походження продовжили генетичну лінію, що циркулювала у світі, і Україні зокрема, з 2008 року. Штам V/Wisconsin/01/2010 був у складі рекомендованого переліку вакцини на поточний сезон 2012-2013 років. Усі ізоляти кластеру несли заміщення S150I і N165Y. Тут розташувалась половина виділених нами ізолятів у 2012 - 2013 роках переважно з Києва та Хмельницького [151]. Віруси набули ряд заміщень: T37A, T181K, G229D, K298E і E312K, а група з українськими ізолятами також і Q122K. У даній групі виділились 5 штамів з заміщення G414S. Їх висока подібність між собою вказує на походження зі спільного джерела всередині країни (рис. 6.1).

Кластер V/Massachusetts/02/2012. Кластер є новим відгалуженням, яке бере початок у 2012 році і є еволюційним продовженням V/Brisbane/3/2007-подібних вірусів, які селектували заміщення R48K і P108A (рис. 6.1). Додатково ізоляти поточного сезону набули тільки одне заміщення T181A. Інші нуклеотидні зміни несли синонімичний характер. В межах даного кластеру розташувались ізоляти виділені у Києві і Дніпропетровську. Частина українських ізолятів селектувала одиничні АК заміщення (N164S у V/Ukraine/5816/13, T75N у V/Ukraine/5897/13, і M251L у V/Ukraine/5940/13).

Не була виявлена розбіжність у часі виділення ізолятів з різних кластерів, тобто вони циркулювали одночасно у березні-квітні 2013 року.

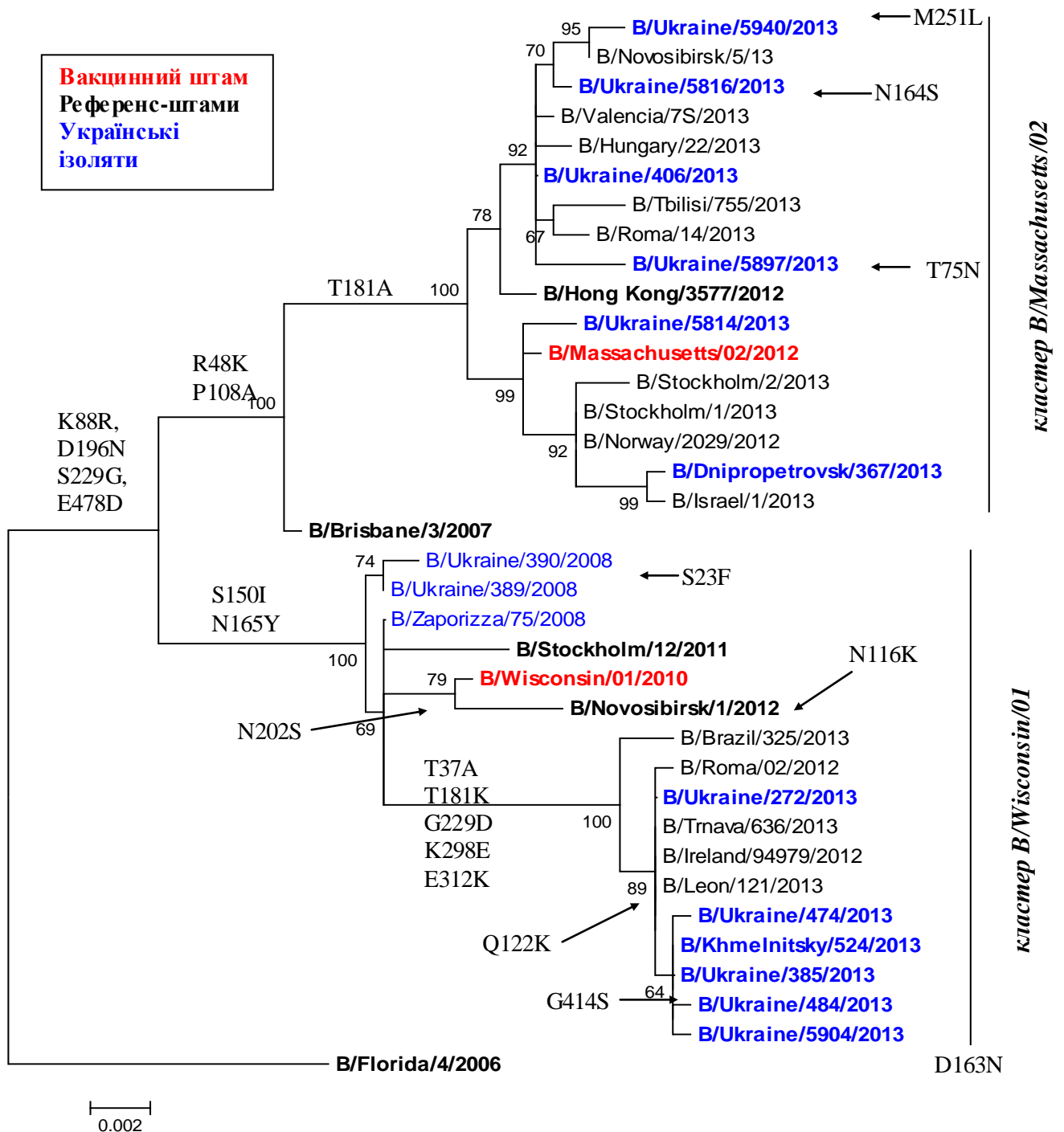


Рисунок 6.1. Філогенетичне дерево вірусів грипу В/Yamagata сезону 2012-2013 за послідовностями генів гемаглютиніну (HA), побудоване методом NJ модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

Аналіз за генами нейрамінідази повністю корелював з аналізом за генами гемаглютиніну. Виділені в Україні ізоляти розділились на два генетичні кластери В/Wisconsin/01/2010 і В/Massachusetts/02/2012-подібні (рис. 7.2).

Кластер В/Wisconsin/01/2010. Кластер характеризувався цілим рядом амінокислотних заміщень Q42R, A68T, T125K, K186R, D340N, D463N і A465T. Ізоляти сезону 2012-2013 років також селектували заміщення T72A і S198N. Українські штами знову розташувались щільно і були результатом одиничного занесення на територію країни. Штам В/Ukraine/272/13 набув заміщення V422I [151](рис. 6.2).

Кластер В/Massachusetts/02/2012. Цей новий кластер разом зі штамом В/Brisbane/3/2007 характеризувався заміщенням I248V, а без нього — T106I і S295R. Українські ізоляти розташувались дисперсно і були подібними до вірусів переважно з європейського регіону. Також майже кожен ізолят показав додаткові заміщення, серед яких: I262M, A290V - у В/Ukraine/5897/13, C54Y - у В/Ukraine/5816/13, A68E - у В/Ukraine/406/13, та P76S, A358T і E392G - у В/Ukraine/5814/13 (рис. 6.2).

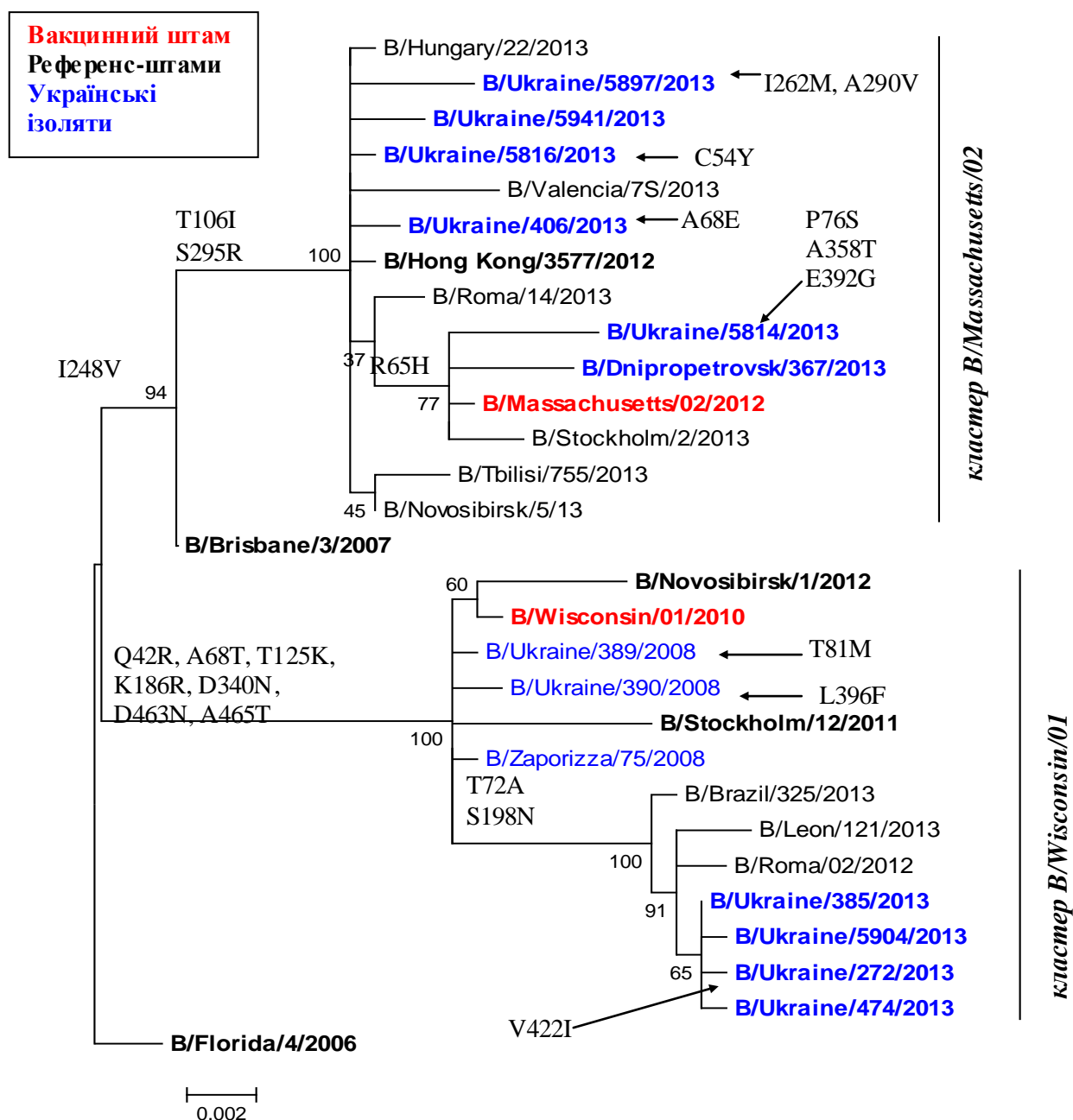


Рисунок 6.2. Філогенетичне дерево вірусів грипу В/Yamagata сезону 2012-2013 за нуклеотидними послідовностями генів нейрамінідази (NA), побудоване методом NJ модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій

Таким чином, частин виділених в Україні вірусів грипу В/Yamagata сезону 2012-2013 років знаходилась у кластері B/Massachusetts, а інша ж частина була подібна до вакцинного штаму B/Wisconsin/01/2010. Схожа

картина спостерігалась в усьому світі, і призвела до перегляду вакцинного штаму на сезон 2013-2014, який став штам В/Massachusetts/02/2012.

Генетична характеристика вірусів грипу типу В генетичної гілки В/ Yamagata 2013-2014 років.

Для філогенетичного аналізу були взяті послідовності генів гемаглютиніну та нейрамінідази єдиного сиквенованого ізоляту, виділеного в Україні В/Dnipro/177/2014. Послідовності вакцинного штаму В/Massachusetts/02/2012, референс-ізолятів та вірусів, виділених по всьому світі, були взяті зі світової бази даних по грипу GISAID, за результатами BLAST – аналізу.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену гемаглютиніну (HA)

Результати філогенетичного аналізу, представлені на рисунку 6.3, показали, що досліджуваний ізолят В/Dnipro/177/2014 розташувався в межах кластеру В/Wisconsin/01/2010. Загалом ізоляти вірусу грипу В/Yamagata, виділені в інших країнах в сезоні 2013 – 2014 років знаходились у двох генетичних кластерах: В/Wisconsin/01/2010 і В/Massachusetts/02/2012. Варто зазначити, що для поточного сезону вакцинним штамом був обраний В/Massachusetts/02/2012, тоді як В/Wisconsin/01/2010 — для минулих сезонів. У сезоні 2012 – 2013 років, коли ізоляти грипу В/Yamagata повернулись у циркуляцію в країні після 2008 року, виділені нами віруси знаходились в обох генетичних кластерах, а в поточному сезоні В/Dnipro/177/2014 був подібний до вірусів, які беруть початок від штаму В/Brisbane/03/2007.

Таким чином серед вірусів грипу В/Yamagata спостерігався низький рівень еволюційної мінливості.

Ізоляти обох кластерів селектували амінокислотні заміщення K88R, D196N і E478D порівняно зі штамом В/Florida/4/06. Детальна характеристика кластерів подана нижче.

Кластер В/Wisconsin/01/2010. Ізоляти даного походження продовжили генетичну лінію, що циркулювала у світі і Україні зокрема, з 2008 року. Штам В/Wisconsin/01/2010 був у складі рекомендованого переліку вакцини на сезон 2012-2013 років. Усі ізоляти кластеру несли заміщення S150I, N165Y і S229D, а віруси, крім В/Stockholm/12/2011, набули заміщень K298E і E312K. Два ізоляти - з Литви і Арізони (США), які географічно далеко розташовані між собою, набули заміщень T37A, Q122K і T181K. У більшості вірусів даного кластеру спостерігались заміщення N202S і N116K (рис.6.3)

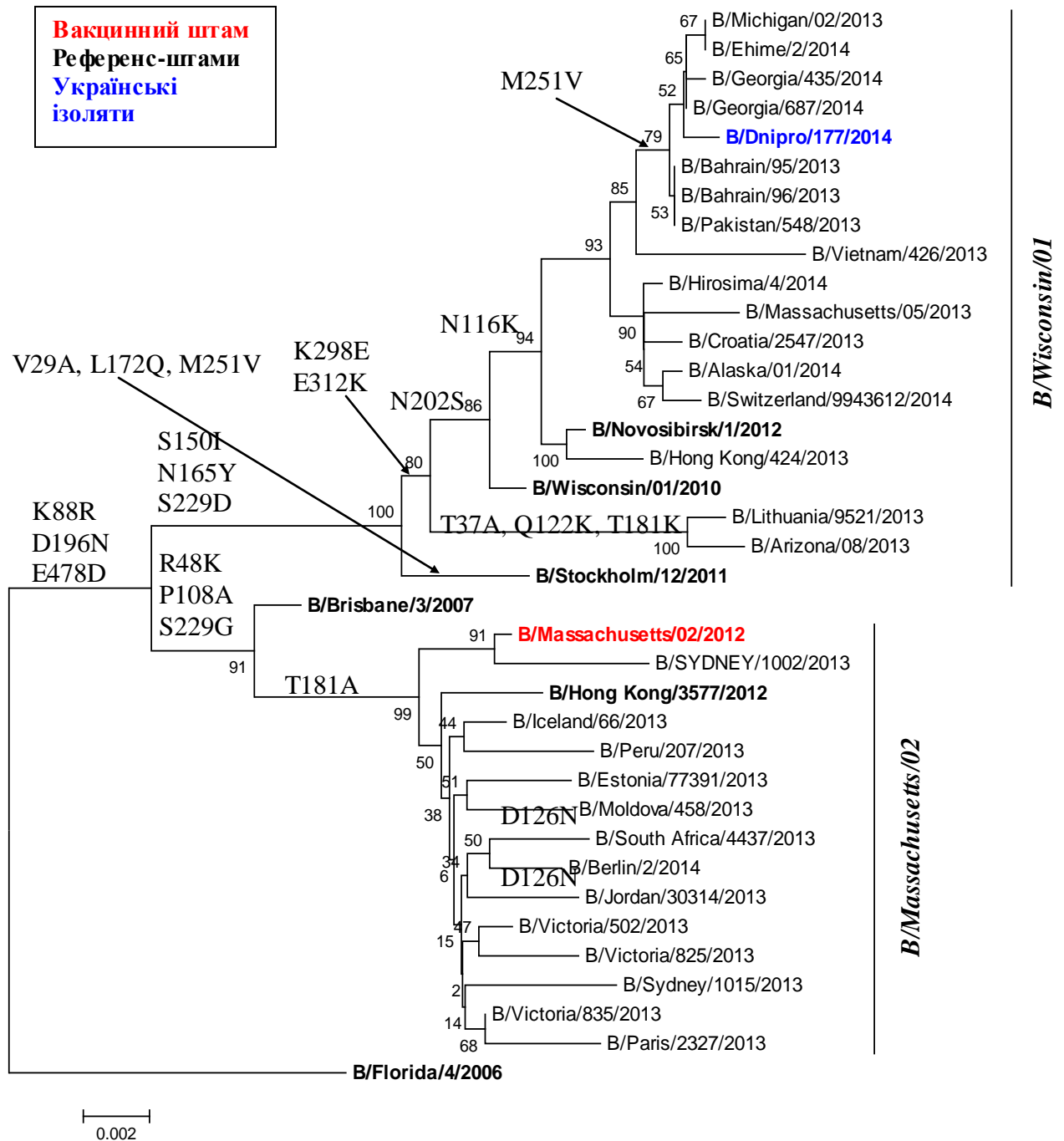


Рисунок 6.3. Філогенетичне дерево вірусів грипу В/Yamagata сезону 2013 – 2014 за послідовностями генів гемаглютиніну (НА), побудоване методом NJ модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Група, до якої увійшов наш ізолят B/Dnipro/177/2014, показала заміщення M251V, за якого метіонін заміщувався на валін. У ізолята з Дніпропетровська не були виявлені унікальні мутації. Найбільш подібними

до нього за генами гемаглютиніну виявились ізоляти з Грузії, Ехіме (Японія) та Мічігану (США).

Кластер В/Massachusetts/02/2012 є новим відгалуженням, яке бере початок у 2012 році і є еволюційним продовженням В/Brisbane/3/2007-подібних вірусів, які селектували заміщення R48K, P108A і S229G (рис.7.3). Ізоляти поточного сезону, як і в минулому році, показали тільки одне заміщення T181A. Інші нуклеотидні зміни несли синонімічний характер. У межах даного кластеру розташувались ізоляти виділені в Австралії, країнах Європи, Азії, Південній Африці та Америці.

Віруси з обох кластерів циркулювали одночасно у світі. Обмежені дані не дозволили виявити присутність ізолятів кластеру В/Massachusetts/02/2012 в Україні, хоча ми не виключаємо такої можливості, зважаючи на минулий сезон.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

Аналіз послідовностей за геном нейрамінідази показав подібні результати з аналізом за геном гемаглютиніну, зокрема розташування вірусів сезону 2013 - 2014 років у межах двох кластерів В/Wisconsin/01/2010 і В/Massachusetts/02/2012 (рис.6.4).

Детальний аналіз кожного кластеру поданий нижче.

Кластер В/Wisconsin/01/2010 характеризувався заміщеннями Q42R і A68T. Більшість вірусів кластеру, як і всі ізоляти минулого сезону, несли цілий ряд амінокислотних заміщень T125K, K186R, D340N, D463N і A465T. Але в поточному сезоні утворилась нова група вірусів, які за генами гемаглютиніну набули одного заміщення, а за генами нейрамінідази показали 24 нові заміщення: R42P, I45V, I49T, M50V, V71L, T125N, E148G, S198N, I204V, K219N, N220K, D235N, P244S, I248V, S295R, E320D, K343E, A358K, K373E, T389A, E392D, L396F, E404K і T436E. До цієї групи увійшов і наш досліджуваний ізолят В/Dnipro/177/2014, а також віруси з Грузії, Пакистану та Мічігану (США). Серед інших ізолятів кластеру

мутаційна мінливість теж була вищою, порівняно зі змінами в гемаглютиніні (рис.6.4).

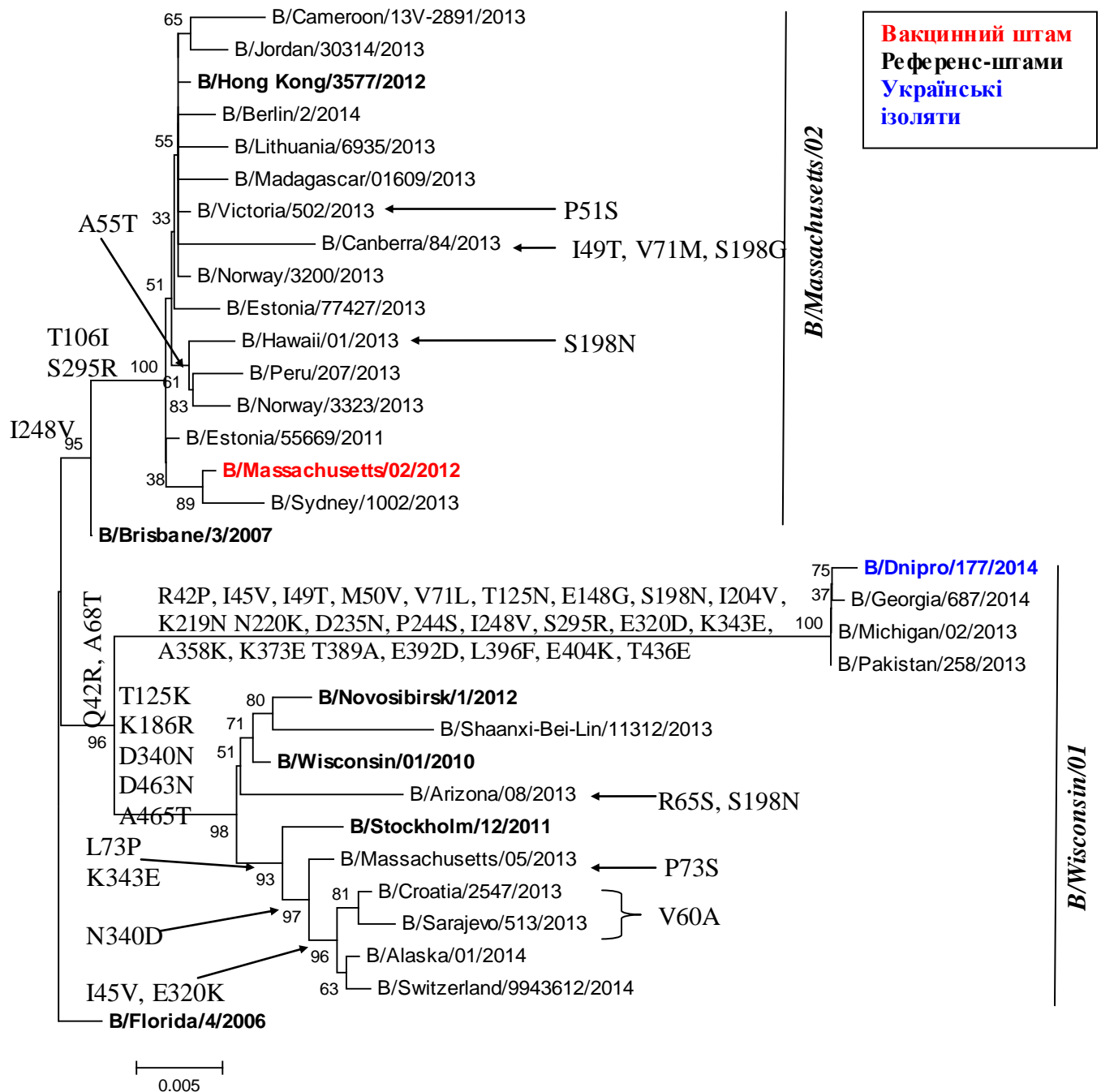


Рисунок 6.4. Філогенетичне дерево вірусів грипу В/Yamagata сезону 2013 - 2014 за нуклеотидними послідовностями генів нейрамінідази (NA), побудоване методом NJ модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Кластер В/Massachusetts/02/2012 показав нижчий рівень мутацій, порівняно з кластером В/Wisconsin/01/2010. Разом зі штамом В/Brisbane/3/2007 спостерігалось заміщення I248V, а без нього - T106I і S295R. До кластеру увійшов референс-штам В/Hong Kong/3577/2012 і ізоляти з усіх континентів (рис.6.4).

Таким чином, єдиний сиквенований ізолят грипу сезону 2013 - 2014 В/Dnipro/177/2014, виділений в Україні, знаходився у кластері В/Wisconsin/01/2010, хоча ізоляти з інших країн розташувались у межах обох генетичних кластерів, подібно минулому сезону. Також наш ізолят набув ряд заміщень у нейрамінідазі, і з подібними собі ізолятами сформував нову групу в межах кластеру В/Wisconsin.

Генетична характеристика вірусів грипу типу В генетичної гілки В/Yamagata 2014-2015 років.

Віруси грипу типу В генетичної гілки В/Yamagata домінували в Україні в сезоні 2014-2015, причому їх активність минулого епідемічного сезону була найнижчою за останні роки, починаючи з 2008 року. Для філогенетичного аналізу були взяті послідовності генів гемаглютиніну та нейрамінідази сиквенованих ізолятів, виділених з дозорних центрів в Україні : В/Kharkov/266/2015, В/Zaporizza/339/2015, В/Zaporizza/333/2015, В/Ukraine/1/2015, В/Ukraine/361/2015, В/Odessa/393/2015, В/Odessa/230/2015, В/Odessa/390/2015, В/Odessa/234/2015, В/Dnipro/347/2015, В/Ukraine/497/2014. Також були взяті штами з рутинного дозору: В/Ukraine/6469/2015, В/Ukraine/6458/2015, В/Ukraine/6368/2015, В/Ukraine/6787/2015, В/Ukraine/6452/2015, В/Ukraine/6792/2015; послідовності вакцинних штамів В/Massachusetts/02/2012 та В/Phuket/3073/2013, референс-ізоляти та віруси, виділені по всьому світі, були взяті зі світової бази даних по грипу GISAID, за результатами BLAST – аналізу.

*Філогенетичне порівняння послідовностей гену
гемаглютиніну (НА)*

Результати філогенетичного аналізу, представлені на рисунку 6.5, показали, що досліджувані українські ізоляти сезону 2014-2015 років знаходяться в межах кластеру В/Wisconsin/01/2010. Загалом ізоляти грипу В/Yamagata, виділені в інших країнах знаходились у межах двох генетичних кластерів: В/Wisconsin/01/2010-В/Phuket/3073/2013 і В/Massachusetts/02/2012. Варто зазначити, що для поточного сезону так і для попереднього вакцинним штамом був обраний В/Massachusetts/02/2012, тоді як В/Wisconsin/01/2010 – для минулих сезонів. Незначна кількість ізолятів з інших країн, розташованих в генетичному кластері В/Massachusetts/02/2012, зберегли подібність до вакцинного штаму на досить низькому рівні (20%). Більшість ізолятів поточного сезону виявили подібність на рівні 80% до В/Phuket/3073/2013, який став новим вакцинним штамом і був включеним до складу вакцин на наступний епідемічний сезон 2015-2016 років.

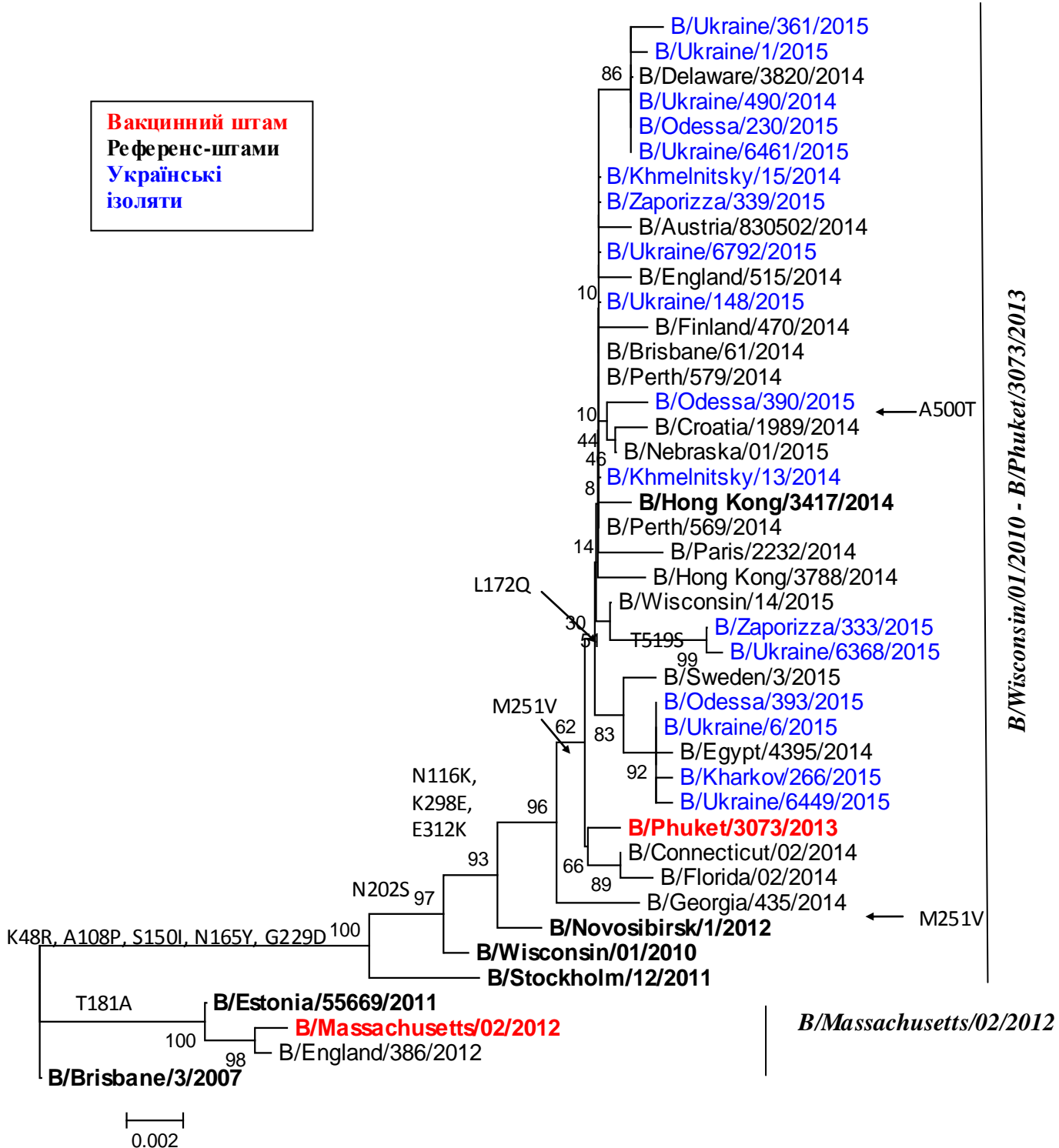


Рис.6.5. Філогенетичне дерево вірусів грипу В/Yamagata сезону 2014-2015 за послідовностями генів гемаглютиніну (НА), побудоване методом NJ модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Ізоляти обох кластерів набули амінокислотні заміщення K88R, D196N і E478D порівняно зі штамом B/Florida/4/06. Детальна характеристика заміщень у кластерах подана нижче.

Кластер В/Wisconsin/01/2010-В/Phuket/3073/2013. Ізоляти даного походження продовжили генетичну лінію, що циркулювала у світі і Україні зокрема, з 2008 року (рис. 6.5). До складу вакцини на сезон 2014-2015 рекомендовані штами В/Phuket/3073/2013 та В/Massachusetts/02/2012. Всі ізоляти кластеру несли заміщення K48R, A108P, S150I, N165Y і S229D, які відрізняли їх від референс штаму В/Brisbane/3/2007. Віруси, окрім В/Stokholm/12/2011 та В/Wisconsin/01/2010, набули нових точкових мутацій – N116K, K298E та E312K. У більшості вірусів даного кластеру спостерігались заміщення L172Q. Українські ізоляти В/Odessa/393/2015, В/Kharkov/266/2015 та В/Ukraine/6449/2015 виокремились в окрему групу і селектували мутацію M251V (метіонін заміщувався валін). У штаму В/Georgia/435/2014 також спостерігалась ця мутація, проте до даної групи він не ввійшов. Найбільш подібними до цієї групи виявились штами з Швеції та Єгипту, а також недалеко розмістився вакцинний ізолят В/Phuket/3073/2013. Два ізоляти - В/Zaporizza/333/2015 та В/Ukraine/6368/2015 мали унікальне точкове заміщення T519S (треонін заміщувався на серин). Найближче до них розмістився штам В/Wisconsin/14/2015, проте такої мутації він не селектував. Точкове заміщення A500T (аланін заміщувався на треонін) спостерігалось у українського ізоляту В/Odessa/390/2015, найбільш подібними до нього виявились ізоляти з Хорватії та Небраски (США).

Кластер В/Massachusetts/02/2012 є новим відгалуженням, яке є еволюційним продовженням В/Brisbane/3/2007-подібних вірусів. (рис.6.5). Ізоляти даної групи показали тільки одне заміщення T181A (треонін заміщувався на аланін).

Віруси з обох кластерів циркулювали одночасно у світі [53]. В поточному сезоні серед українських ізолятів не було виявлено вірусів, які б за результатами філогенетичного аналізу відносились до кластеру В/Massachusetts/02/2012.

Філогенетичне порівняння послідовностей гену нейрамінідази (NA)

Аналіз за генами нейрамінідази показав подібні результати з аналізом за генами гемаглютиніну, зокрема переважне розташування вірусів сезону 2014-2015 років у кластері B/Wisconsin/01/2010(рис.6.6). Ізоляти минулого сезону були розміщені у межах двох кластерів B/Wisconsin/01/2010 і B/Massachusetts/02/2012.

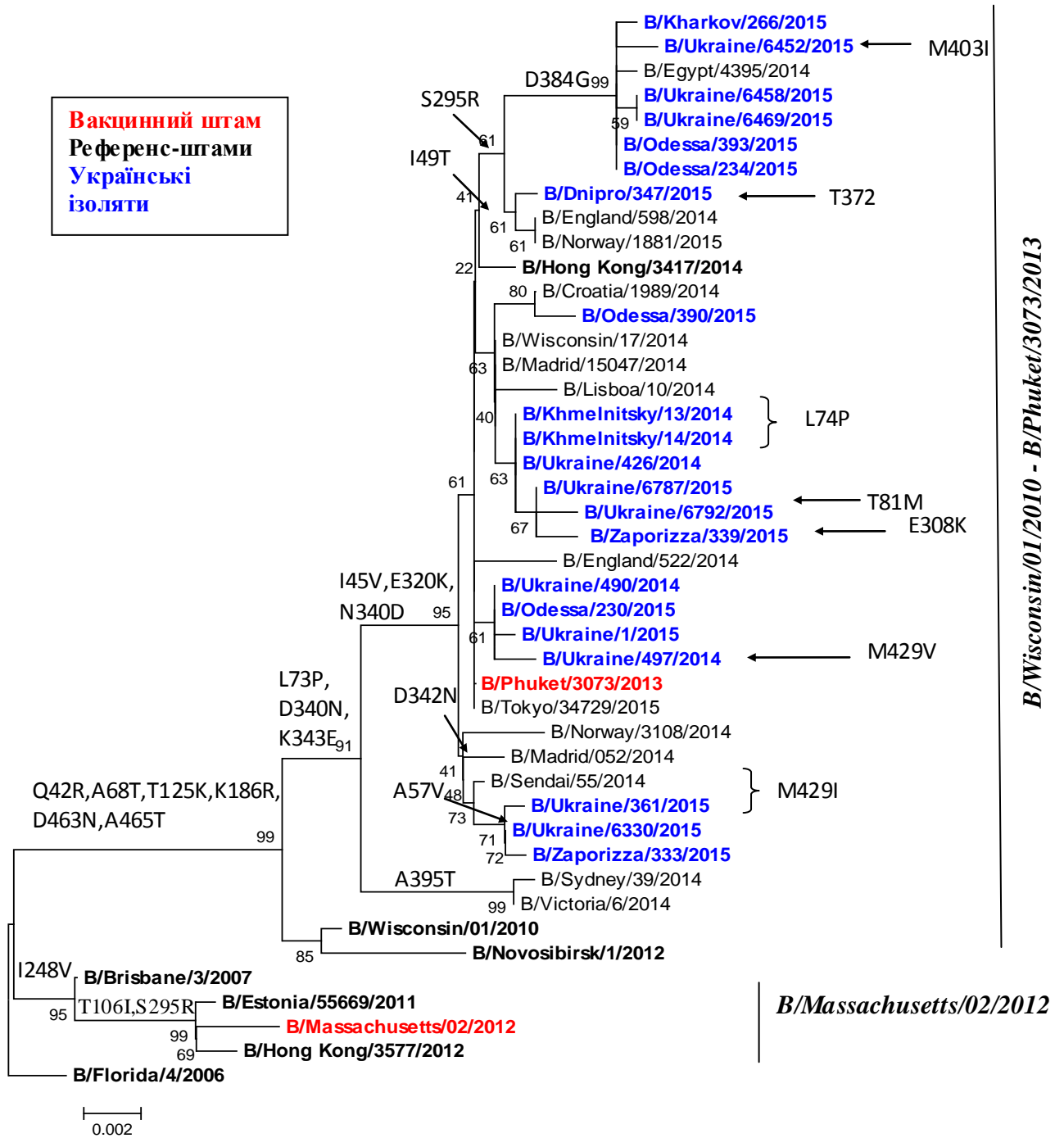


Рис. 6.6. Філогенетичне дерево вірусів грипу В/Yamagata сезону 2014-2015 за нуклеотидними послідовностями нейрамінідази (NA), побудоване методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

З філогенетичного аналізу генів нейрамінідази видно, що вони мали більшу мутаційну активність ніж гени гемаглютиніну.

Детальний аналіз кожного кластеру поданий нижче.

Кластер В/Wisconsin/01/2010-В/Phuket/3073/2013 характеризувався заміщеннями Q42R і A68T. Більшість вірусів кластеру, як і всі ізоляти минулого сезону, несли цілий ряд амінокислотних заміщень T125K, K186R, D463N і A465T [53]. Але в поточному сезоні утворилась нова група вірусів, які за генами нейрамінідази набули ряду нових заміщень: I45V, I49T, L73P, E320K, D340N, K343E. Українські ізоляти В/Ukraine/361/2015, В/Ukraine/6330/2015 та В/Zaporizza/333/2015 виокремились в окрему групу та селектували мутацію A395T. Найбільш подібним до них ізолятом виявився В/Sendai/55/2014, який разом з В/Ukraine/361/2015 мав мутацію M429I, та штами з Норвегії і Мадриду з спільною заміною D342N.

Штами В/Ukraine/490/2014, В/Odessa/230/2015, В/Ukraine/1/2015 та В/Ukraine/497/2014 мали найбільшу подібність до вакцинного штаму В/Phuket/3073/2013 і штаму з Токію. Ізолят В/Ukraine/497/2014 утворив точкову мутацію M429V.

Мутація L74P спостерігалась у двох українських ізолятів В/Khmelnytsky/13/2014 та В/Khmelnytsky/14/2014, подібними до яких був В/Ukraine/6792/2015, що селектував точкову мутацію T81M, ізолят В/Zaporizza/339/2015 з мутацією E308K та інші ізоляти з Мадриду, Вісконсину та Лісабону (рис.6.6).

Ізоляти В/Odessa/234/2015, В/Odessa/393/2015, В/Ukraine/6469/2015, В/Ukraine/6458/2015, В/Ukraine/6452/2015 та В/Kharkov/266/2015 об'єднались в окрему групу спільною мутацією D384G. Штам В/Ukraine/6452/2015 селектував нову точкову мутацію M403I. Також в цю

групу увійшов ізолят з Єгипту, який був найбільш подібним до українських штамів. Ці ізоляти разом з ізолятом В/Dnipro/347/2015, який мав точкову мутацію Т372А та штамми з Англії і Норвегії, мали спільну заміну S295R і разом з референс-штамом В/Hong Kong/3417/2014 мутацію І49Т.

Кластер В/Massachusetts/02/2012 показав нижчий рівень мутацій, порівняно з кластером В/Wisconsin/01/2010-В/Phuket/3073/2013. Разом зі штамом В/Brisbane/3/2007 спостерігалось заміщення І248V, а без нього — Т106І і S295R. До кластеру увійшов референс-штам В/Hong Kong/3577/2012 і В/Estonia/55669/2011.

Таким чином, сиквеновані ізоляти грипу сезону 2014-2015 років, виділені в Україні знаходились у кластері В/Wisconsin/01/2010-В/Phuket/3073/2013, хоча ізоляти з інших країн розташувались у межах обох генетичних кластерів, подібно минулому сезону. Що свідчить про циркуляцію вірусів обох генетичних кластерів.

Матеріали досліджень, викладені в цьому розділі, опубліковані [150,151].

РОЗДІЛ 7. ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МУТАЦІЙ В ГЕНАХ (амінокислотних заміщень) НА ТА НА ВІРУСІВ ГРИПУ В СЕЗОНІ 2012 – 2015 РОКІВ

7.1. Характеристика мутацій вірусів грипу типу А(Н1N1)pdm09

Відомо, що амінокислотні заміни в білках мають різне значення в залежності від їх місцезнаходження і фізико-хімічних властивостей амінокислот. Значимість амінокислотних заміщень враховується з положенням їх в межах антигенно важливих сайтах або поза ними; втратою або набуттям потенційних сайтів глікозилювання; зміною фізико-хімічних властивостей амінокислот (зміна заряду амінокислотного залишку, зміна полярності). Відомі мутації, котрі зустрічаються в антигенних сайтах, зменшують або інгібують зв'язування нейтралізуючих антитіл, дозволяючи тим самим новому підтипу вірусу широко розповсюдитися серед не імунного прошарку населення. Набуття чи втрата потенційних сайтів глікозилювання впливає на розпізнавання вірусу імунною системою організму людини. Приєднання додаткових сахарів служить як потенційний захист вірусу для уникнення імунного нагляду.

Пандемічні віруси грипу А(Н1N1)pdm поширені по всьому світу та за геном НА відносяться до генетичної групи 6, яка поділяється на А, В, С.

Українські ізоляти за характерними мутаціями відносять до генетичної групи 6В.

Більшість мутацій, таких як D97N, P83S, S203T і т.д. виникли у 2009 році та закріпилися у вірусів і спостерігались протягом наступних сезонів, як видно з таблиці (табл. 7.1).

Таблиця 7.1.

Амінокислотні заміни в послідовностях гену HA та NA вірусів грипу
A(H1N1)pdm

Ген	HA			NA			
	Сезон	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Заміни		P83S, S203T, I321V	P83S, S203T, I321V	P83S, S203T, I321V	V106I, N248D	V106I, N248D	V106I, N248D
		S185T, S451N	S185T, S451N	S185T, S451N	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S
		D97N	D97N	D97N	–	I34V, I321V, K432E	I34V, I321V, K432E
					N386S	N386K	N386K
		K283E, E499K	K283E, E499K	K283E, E499K	–	–	I117M, I365T
		–	K163Q, A256T	K163Q, A256T	–	–	I396M
		A256T					
Унікальні заміни в українських ізолятах	K22R, L44I, K146N, S183P, K160N	T474M, I510V	S84N, D94N, R205K	V83A, R220K, D416N	–	P93H, P198S, H275Y	

Заміна S203T вважається однією з найперших замін в молекулі HA, зареєстрованих у світі. Проте, вона не несе принципових змін в структурі білкової молекули, судячи з всього, віруси, що мають треонін в 203 положенні HA1 володіють деякими селективними перевагами в людській популяції, що сприяє збереженню цієї мутації (рис.7.1).

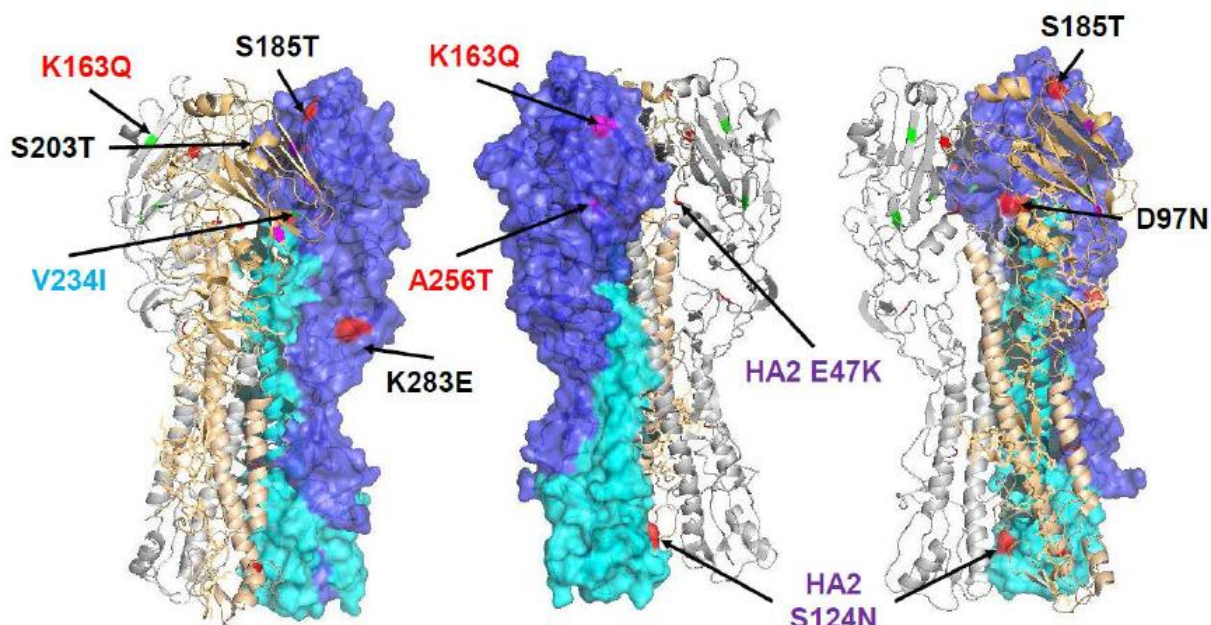


Рис.7.1. Розміщення мутацій в структурі молекули HA вірусів грипу A(H1N1)pdm09 [53]

На відміну від цієї заміни, зміна проліна в 83 положенні на серин була зареєстрована в світі у вірусів трохи пізніше і пов'язана з тиском імунної відповіді організму хазяїна [2].

Група вірусів, що мали мутації K283E, E499K, набули найбільш широкого поширення у світі. Слід відмітити, що амінокислотні заміни, характерні для цієї групи, розміщені поза відомими антигенними сайтами та далеко від рецептор-зв'язуючого сайту. Більш того, мутація E499K знаходиться в молекулі HA2, що може свідчити про неперервний процес мінливості збудника, пов'язаного не тільки з уникненням імунної відповіді, а і з закріпленням мутацій, що дають селективні переваги для функціонування поверхневого білку, який визначає інфекційність вірусу.

Заміщення A256T у сезоні 2012-2013 років спостерігалась лише у одного українського ізоляту, але у сезоні 2014-2015 було виявлене у всіх українських вірусів.

Мутація K163Q, яка виявлялась по всьому світу, в українських ізолятів виникла лише у сезоні 2013-2014 років та спостерігалась у наступних роках [152].

Точкові мутації у гені гемаглютину українських ізолятів, такі як L44I, T474M, D94N виявлялись кожного сезону.

Усі ізоляти вірусів грипу A(H1N1)pdm09, починаючи з 2009 року, несуть дві основні мутації в гені нейрамінідази – V106I та N248D, які у всіх випадках зустрічаються з заміною S203T в HA. Ці заміни знаходяться в областях, які не пов'язані безпосередньо з каталітичними властивостями фермента чи з антигенними сайтами, проте вони спостерігаються у всіх ізолятах вірусів досліджуваних сезонів.

Амінокислотний залишок 241 знаходиться в середині молекули HA, віддалено від активного сайту фермента, в той час як позиція 369 відноситься до антигенно-значущої області.

Протягом сезону 2012-2013 років для українських ізолятів була характерна заміна аспарагіну на серин в 386 положенні, проте в 2013-2014 роках відбулась заміна в цьому ж положенні аспарагіну на лізин. Така ж заміна спостерігалась і в наступному сезоні серед українських ізолятів.

У сезонах 2012-2013 та 2013-2014 років серед українських ізолятів мутації I117M, I365T та I396M не виявлялись, проте вони були наявні у сезоні 2014-2015 років.

У сезоні 2014-2015 в українського ізоляту була виявлена мутація H275Y, яка зумовлює стійкість до озельтамівіру [140].

При дослідженні генів нейрамінідази також виявлялись точкові заміщення, такі як V83A, P93H, P198S.

7.2. Характеристика мутацій вірусів грипу типу A(H3N2)

Філогенетично віруси грипу A(H3N2) за геном HA можна поділити на 7 генетичних груп базуючись на амінокислотних замінах, проте лише

віруси 3 групи циркулюють в світі. Група 3 в свою чергу поділяється на субгрупи 3А, 3В, 3С, в залежності від наявності характерних мутацій. Починаючи з 2013 року субгрупа 3С є найбільш поширеною по всьому світу. Для таких вірусів характерне заміщення S45N, що призвело до набуття потенційного сайту глікозилування (табл.7.2).

Таблиця 7.2.

Амінокислотні заміни в послідовностях гену HA та NA вірусів грипу
A(H3N2)

Ген	HA			NA			
	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015	
Заміни	K62E, – – T212A, S214I	K62E, K144N, L183H, T212A, S214I	K62E, K144N, L183H, T212A, S214I	S367N, K369T, I464L L81P, N402D	S367N, K369T – L81P, N402D	S367N, K369T, I464L L81P, N402D	
	S45N, T48I	S45N, T48I	S45N, T48I	D93G	D93G	D93G	
	Q33R, N278K, N145S	Q33R, N278K, N145S	Q33R, N278K, N145S	E221D, T238A, S416N I62V	E221D – –	– – –	
	–	R142G	R142G	–	–	–	
	–	L157S	L157S	–	V412I, I392T	– I392T	
	D489N	D489N	D489N	–	–	–	
	–	A530V	–	–	Y155F, D251V, S315G	– – –	
	–	I214T	–	–	–	–	
	–	N122D, V529I	–	–	I312T	–	
	–	L3I – –	L3I, N144S, F159Y	– – –	– – –	T267K, I380V M51V	
	Унікальні заміни в українських ізолятів	–	K27R, A128V, I140M, V402I	Q75H, N171K, R261Q	N86D	Q5K, S44P, P45S, P99A, T434I	I30V, F37L, A82S, I392M, V396I

Усі досліджувані ізоляти, як з України, так і з інших країн, мали ряд спільних амінокислотних замін, характерних для кластеру A/Victoria/208/2010, таких як K62E, T212A та S214I. Також, починаючи з сезону 2013-2014 років в українських ізолятів виникла і закріпилась в наступному сезоні заміна K144N (лізин заміщувався на аспарагін) та L183H (лейцин заміщувався на гістидин) [152].

Група мутацій, які спостерігались протягом всіх трьох сезонів - Q33R, N278K, N145S призвели до набуття потенційних сайтів глікозилування [53].

Також слід відмітити, що з 2013-2014 років виникла нова мутація R142G, яка спостерігалась у деяких українських ізолятів двох сезонів і зумовлювала зміну заряду амінокислотного залишку (рис. 7.2).

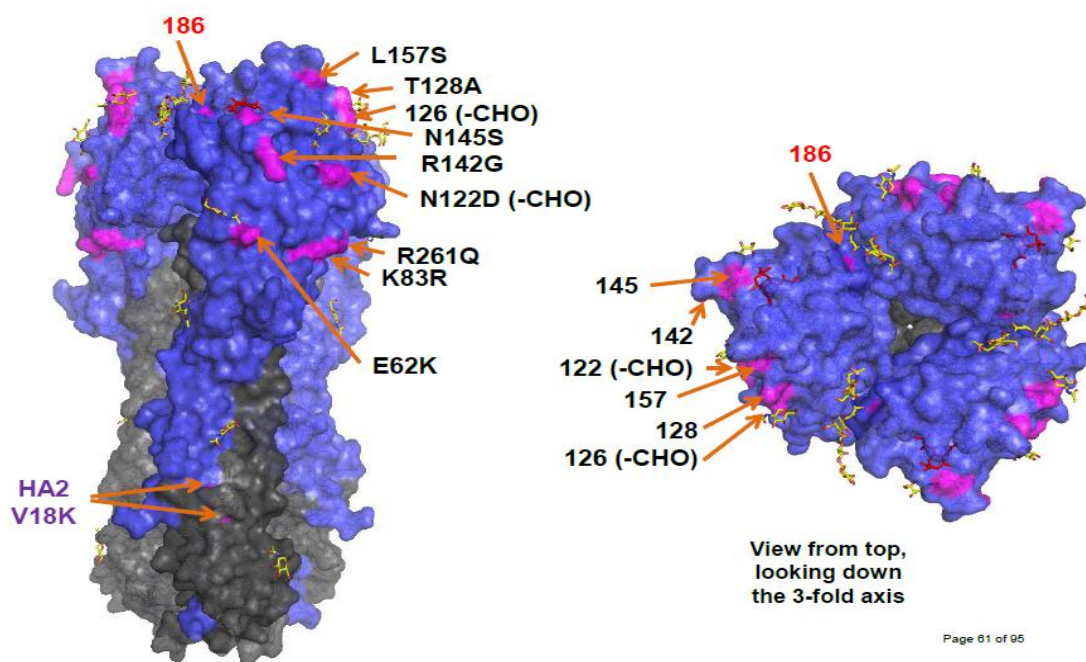


Рис.7.2. Розміщення мутацій в структурі молекули HA вірусів грипу A(H3N2) [53]

Амінокислотні заміщення A530V, I214T, N122D та V529I зустрічалися лише у ізолятів 2013-2014 років, як українських, так і з інших країн.

Поділ вірусів на генетичні групи за геном нейрамінідази відбувався таким же чином, як і за геном гемаглютиніну. В сезоні 2012-2013 років

українські ізоляти належали до 2 субкластерів – 3А та 3С, а починаючи з сезону 2013-2014 циркулювали лише ізоляти групи 3С, які в свою чергу поділились на підгрупи.

Серед ізолятів всіх досліджуваних сезонів спостерігалась наявність подвійної заміни S367N та K369T, яка привела до набуття нового сайту глікозилювання в залишку 367. Інші сайти глікозилювання втрачались в залишку 402 (N402D). Мутації L81P та D93G були присутні протягом трьох сезонів.

Ряд амінокислотних замін були наявні в сезоні 2012-2013 років, такі як E221D, T238A, S416N та I62V та не спостерігалися в наступних роках, лише мутація E221D (глутамат заміщувався на аспартат) була наявна в сезоні 2013-2014 років [152].

У сезоні 2013-2014 також були наявні мутації – Y155F, D251V, S315G та I312T, які не закріпились в ізолятив наступного сезону.

Точкові мутації виникли і у сезоні 2014-2015 років, які не були раніше відмічені в українських ізолятив, а саме - T267K, I380V та M51V.

7.3. Характеристика мутацій вірусів грипу типу В/Yamagata

У період з 2010 по 2012 роки штами вірусів грипу типу В розділились на декілька генетичних груп в середині кластеру В/Bangladesh/3333 (В/Yamagata – lineage) та В/Brisbane/60 (В/Victoria – lineage) в залежності від відповідних мутацій [150].

В 2012-2013 роках віруси грипу гілки В/Yamagata розділились на 2 окремих кластера – В/Wisconsin/01 та В/Massachusetts/02, відрізняючись специфічними замінами (табл. 7.3).

На сьогоднішній день віруси грипу типу В філогенетично поділяють на 3 генетичні групи.

Усі ізоляти протягом трьох сезонів належали лише до генетичної гілки В/Yamagata, проте в попередніх сезонах циркулювали ізоляти обох

генетичних гілок. Українські ізоляти в сезоні 2012-2013 років належали до 2 кластерів – В/Wisconsin/01 та В/Massachusetts/02. Починаючи з 2013-2014 років циркуляція вірусів, що належать до кластеру /Massachusetts/02 на території України не спостерігалась. Впродовж сезонів 2013-2014 та 2014-2015 років циркулювали лише віруси, що належать до кластеру В/Wisconsin/01 (3 група).

Таблиця 7.3.

Амінокислотні заміни в послідовностях гену HA та NA вірусів грипу
В/Yamagata

Ген	HA			NA		
	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Заміни	K88R, D196N	K88R, D196N	K88R, D196N	I248E, T106I, S295R	–	–
	R48K, P108A, T181A	–	–	–	–	–
	–	–	K48R, A108P, S150I, N165Y, G229D	Q42R, A68T, T125K, D463N	Q42R, A68T, T125K, D463N	Q42R, A68T, T125K, D463N
	–	–	–	–	I45V, I49T, S295R, E320D, K343E	I45V, I49T, S295R, E320K, K343E
	–	N202S, N116K	N202S, N116K	–	–	D384G
	–	–	–	–	–	–
	K298E, E312K	K298E, E312K	K298E, E312K	V422I	–	–
	–	M251V	M251V	–	–	–
	–	–	L172Q	–	–	–
Унікальні заміни в українських ізолятах	T75N, N116K, D163N, N164S, M251L	–	A500T	C54Y, A68E, P67S, I262M, I396E	–	L74P, T81M, E308K, M403I, M429I

У послідовностях гемаглютиніна була знайдена мутація D196N (аспарагінова кислота заміщувалась на аспарагін), яка була пов'язана з

набуттям потенційного сайту глікозилювання. Дана мутація спостерігалась протягом усіх досліджуваних сезонів.

Оскільки в сезоні 2012-2013 років ще спостерігалась циркуляція ізолятів, які належали до кластеру B/Massachusetts/02, то вони мали специфічні для цієї групи вірусів мутації - R48K, P108A, T181A, K298E, E312K. Також цього сезону, як і в наступних, циркулювали віруси, що належали до кластеру B/Wisconsin/01. Вони мали спільні заміни – S150I, N165Y. У наступному сезоні 2013-2014 років вони набули додаткову точкову заміну – S229D (серин заміщувався на аспарагінову кислоту), а в сезоні 2014-2015 додалися K48R та A108P.

Спільні заміни, характерні для кластеру B/Wisconsin/01 мали віруси, починаючи з 2013 по 2015 роки, а саме – N202S, N116K, M251V (рис.8.3).

У сезоні 2014-2015 років українські ізоляти селектували нову точкову заміну L172Q (лейцин заміщувався на глутамін) [152].

У послідовностях генів нейрамінідази були виявлені амінокислотні заміни, характерні для кластеру B/Massachusetts/02 – I248E, T106I, S295R, так як спостерігалась його циркуляція в 2012-2013 роках.

Проте, оскільки протягом всіх сезонів циркулювали віруси грипу кластеру B/Wisconsin/01 вони мали ряд спільних мутацій, таких як Q42R, A68T, T125K, D463N.

Під час 2013-2014 років в українського ізоляту, разом з подібними до нього, спостерігалось більше 20 мутацій, частина з яких зустрічалась і наступного сезону – I45V, I49T, S295R, E320K, K343E. Також у сезоні 2014-2015 виникла мутація D384G (аспарагінова кислота заміщувалась на гліцин) у деяких українських ізолятів.

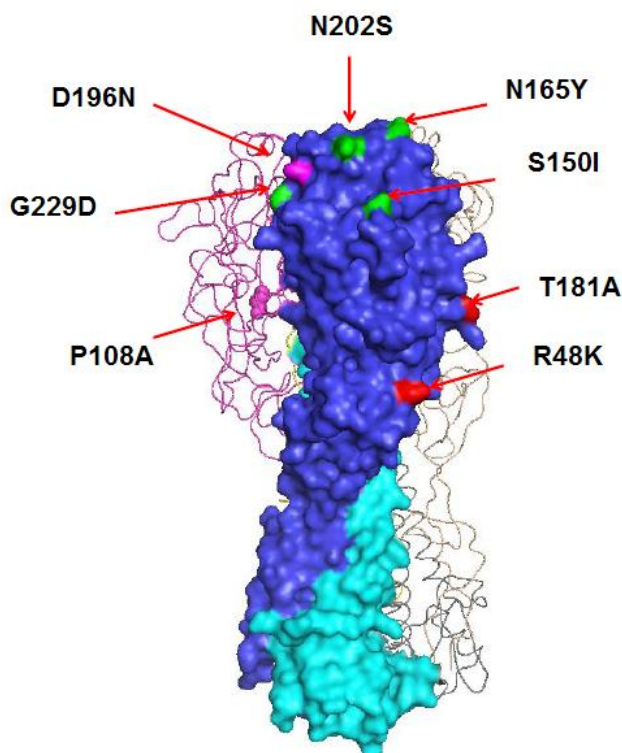


Рис.7.3. Розміщення мутацій в структурі молекули НА вірусів грипу В/Yamagata [53]

Отже, кожного сезону в результаті сиквенування як генів гемаглютиніну, так і генів нейрамінідази, вдалось виявити виникнення великої кількості унікальних амінокислотних замін, які не впливали на антигенну чи на інші функціональні ділянки. Частина цих мутацій виникла, зокрема, як наслідок культивування на культурі клітин, а багато з них так і залишаються не розшифрованими.

В результаті дослідження мутацій, які зумовлюють виникнення стійкості до противірусних препаратів, таких як озельтамівір, було виявлено лише у одного українського ізоляту 2015 року протягом усього періоду нашого спостереження.

Матеріали досліджень, викладені в цьому розділі, опубліковані [140,150, 152].

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Розвиток та впровадження молекулярно-генетичних методів дослідження структури і властивостей білків вірусів грипу в останні роки сприяли більш повному розумінню механізмів їх еволюційної мінливості.

Інтенсивне вивчення молекулярної еволюції вірусів грипу надає важливу інформацію щодо сезонного генезису та поширення їх серед людей.

Порівняння властивостей нових штамів вірусів з вже охарактеризованими референс-вірусами минулих років дозволяє робити прогнози відносно можливої вірулентності та трансмісивності цих збудників, про патогенез інфекції, викликані такими вірусами, а також прогнозування появи змінених штамів як збудників епідемій та пандемій [2].

Впродовж досліджуваних сезонів спостерігалась постійна зміна провідних збудників епідемій. Кожного сезону відсоткове співвідношення вірусів грипу, що викликали захворюваність, змінювалась.

Протягом трьох сезонів циркулювали всі три збудники – А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) та В у різному відсотковому співвідношенні. Так вірус грипу А(Н1N1)pdm09 грав ключову роль в епідемічному процесі 2012-2013 років, де його відсоткова частка становила $(45,6 \pm 3,3)$ %. А в сезоні 2013-2014 років його частка була найменшою – $(4,2 \pm 1,5)$ %, в той час як вірус грипу А(Н3N2) переважав та становив $(73,3 \pm 3,4)$ %. У сезоні 2014-2015 років домінуючим збудником був вірус грипу В, генетичної гілки В/Yamagata.

Віруси грипу людей типу А виділялись в усіх трьох досліджуваних епідемічних сезонах з 2012 по 2015 роки.

Генетичний аналіз послідовностей традиційно проводили за генами, що кодують поверхневі антигени: гемаглютинін (НА) та нейрамінідазу (НА) кожного з субтипів вірусів грипу А: А(Н3N2) та А(Н1N1)pdm09.

Сезонні віруси грипу А(Н1N1) не виділялися як в Україні так і в інших країнах після 2008 року. Посезонний генетичний аналіз проводили методом Neighbor-Joining (об'єднування найближчих сусідів).

Українські ізоляти А(Н1N1)pdm09 за характерними мутаціями відносять до генетичної групи 6В.

Більшість мутацій, таких як D97N, P83S, S203T і т.д. виникли у 2009 році закріпилися у вірусів і спостерігались протягом наступних сезонів.

Ізоляти пандемічних вірусів грипу А(Н1N1)pdm09 сезону 2012-2013, виділені в Україні, були генетично подібними до вакцинного та референс-штамів на рівні 97%, проте, накопичили поодинокі генетичні заміни, які розділили їх на філогенетичних деревах у різні групи.

Усі ізоляти віруси грипу А(Н1N1)pdm09, починаючи з 2009 року, несуть дві основні мутації в гені нейрамінідази – V106I та N248D, які у всіх випадках зустрічаються з заміною S203T в НА [140]. Ці заміни знаходяться в областях, які не пов'язані напряму з каталітичними властивостями фермента чи з антигенними сайтами, проте вони спостерігаються у всіх вірусів досліджуваних сезонів.

Усі відібрані для аналізу послідовності вірусів грипу показали амінокислотні заміщення в гемаглютинині P83S, S203T і I321V, порівняно з вакцинним штамом А/California/07/2009. Заміщення E347K, S451N і S185T були виявлені у всіх ізолятів, виділених за 2012-2013 рр., а також у деяких раніше ізольованих штамів [147].

Штам А/Zaporizka/417/2013 характеризувався амінокислотними заміщеннями S143G і A197T (кластер 1), а у ізолятів зі США і нашого штаму виявили D84G. Ізолят А/Ukraine/3/13 набув додаткове заміщення K22R і А/Ukraine/523/13 із заміщеннями A256T і H273N (разом з вірусом з Норвегії), та S183P, які разом з ізолятами з інших країн увійшли до 2 кластеру. Третя група об'єднала найбільше українських ізолятів, в яких були виявлені поодинокі АК заміщення: K146N — у А/Dnipro/252/13, K160N — у А/Kmel'nitsk/354/13 і L44I — у А/Ukraine/156/13. У двох

ізолятів (з Кірова і Польщі) спостерігалось заміщення D222G, з яким, за літературними даними, асоціюють ускладнення перебігу грипозного захворювання [128].

Мінливість гену нейрамінідази була менш інтенсивною за таку у гемаглютиніну. Так, українські ізоляти розташувались у двох генетичних групах. Без змін залишилась група A/Hong Kong/5659/2012-подібних вірусів, яка розташувала виділені нами ізоляти A/Ukraine/3/13 і A/Ukraine/523/13. А інші 8 ізолятів вірусів за нейрамінідазою були подібні до референс-штаму A/St.Peterburg/100/2011. Основні зміни полягали у об'єднанні ізолятів з 1 і 3 груп, і відокремленні референс-штаму A/St.Peterburg/27/2011 до другої групи.

Серед амінокислотних заміщень у нейрамінідазі варто виділити Y351F, яке спостерігалось у всіх ізолятів окрім вакцинного штаму A/California/07/2009, та V106I і N248D — окрім A/California/07/2009 і A/Bayern/69/2009. У штамів двох груп, сформованих за участі виділених нами штамів, спостерігались заміщення V241I і N369K.

Ізоляти першої групи характеризувались амінокислотним заміщенням N44S, а крім референс-штаму — I106V і N200S. Група сформувала два розгалуження. Перше — із заміщеннями L40V, A76V і N222D, куди увійшов штаб із Запоріжжя, який показав додаткове заміщення D416N. Друге — всі ізоляти, що за гемаглютиніном знаходились у першій групі. Серед цих ізолятів у штаму A/Ukraine/11/13 виявлено заміщення V83A і R220K, а в A/Ukraine/312/13 — W455F.

За результатами філогенетичного аналізу було виявлено, що всі ізоляти, виділені в різних країнах світу як в сезонах 2013 – 2014, так і 2014-2015 років, належали до підтипу A(H1N1)pdm09, були генетично подібними до референс-штаму A/South Africa/3626/2013, а також зберегли подібність до вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) на рівні 96%.

Віруси сезону 2013 - 2014 років за геном гемаглютиніну показали заміщення K283E і E499K, а частина з них також - K163Q і A256T, які

були виявлені й у вірусів сезону 2012 – 2013 років. Вони розташовані на філогенетичному дереві від A/Hong Kong/5659/2012 і вище та селектували заміщення D97N, яке збереглося й у ізолятів сезону 2014 - 2015. У ізоляту A/Ukraine/28/2014 було виявлено унікальне заміщення I510V (ізолейцин замінювався на валін), а також разом зі штамом A/Lisboa/4/2014 - заміщення T474M (треонін заміщувався на метіонін).

При аналізі послідовностей нейрамінідази найбільша генетична подібність ізолятів сезону 2013 - 2014 років була виявлена до референс-штаму A/South Africa/3626/2013. У всіх взятих для аналізу послідовностях, крім вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) і референс-штаму A/Bayern/69/2009, було присутнє заміщення в нейрамінідазі N248D. Мутація V106I, яка з'явилась ще у 2009 році, у ізолятів сезону 2013 – 2014 рр. ревертувала до дикого типу – I106V, як у A/California/07/2009 і A/Bayern/69/2009.

Група ізолятів сезону 2013 - 2014 років, починаючи від штаму A/Mississippi/10/2013, куди входить й український ізолят A/Ukraine/28/2014, набула заміщень N44S і N200S. На цьому рівні відбулась реверсія I106V. На відміну від гемаглютиніну в нейрамінідазі досліджувального штаму A/Ukraine/28/2014 унікальних заміщень виявлено не було.

Що до сезону 2014-2015 років, то лише два досліджуваних українських ізолята мали заміщення: A/Dnipro /454/2015 – у якого було виявлено унікальне заміщення D94N (аспарагінова кислота замінювалася на аспарагін) та ізолят A/Ukraine/433/2015, де спостерігалось заміщення аргініну лізином в 205 положенні (R205K), а також разом з ізолятом A/Berlin/81/2014 - заміщення S84N (серин заміщувався на аспарагін).

Ізоляти сезону 2014-2015 років, крім A/Ghana/Dili-0620/2014, в послідовності гену нейрамінідази набули три заміщення I34V, I321V і K432E, які зустрічалися у вірусів сезону 2013-2014, але не зустрічалися у вірусів сезону 2012-2013 років. Усі українські ізоляти, включаючи

A/Hamburg/06/2014 і вище, мали заміщення I117M та I365M, крім штаму з Гамбурга. Також точкові мутації мають ізоляти A/Odessa/232/2015 – P198S та A/Ukraine/160/2015, разом з A/England/02/2015 та A/Iasi/17881/2015, заміщення S339L. Ізолейцин замістив метіонін (I396M) у майже половини українських ізолятів, що розмістилися у верхній частині філогенетичного дерева поруч з ізолятом з Нідерландів A/Netherlands/466/2014. Саме таке заміщення має ізолят зі Швейцарії A/Switzerland/485/2015, хоча він і знаходиться дещо далі від вказаних вірусів і має ще одну точкову мутацію N434S. Ще одне унікальне заміщення P93H у послідовності нейрамінідази виявлено в українського ізоляту A/Dnipro/454/2015.

Таким чином, мінливість пандемічних вірусів грипу у сезоні 2014-2015 залишилась на низькому рівні, як і в попередніх 2012-13 та 2013-14 роках. Часті реверсії свідчать про ще не вичерпаний інфекційний потенціал «старих штамів». Низький рівень мутаційних змін в ізолятах поточної епідемії зберігає високу подібність пандемічних вірусів грипу до вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1), який залишився незмінним і його включено до складу вакцин на наступний епідемічний сезон 2015-2016 рр.

Проаналізувавши послідовності генів гемаглютиніну українських ізолятів, можна зробити висновок, що популяція циркулюючих в Україні вірусів грипу A(H3N2) була надзвичайно гетерогенною, а штами заносились з різних географічних зон світу. Частина виділених нами ізолятів набула нових мутацій, які мають шанс закріпитися в наступних епідсезонах.

У сезоні 2012-2013 років українські ізоляти вірусів грипу A(H3N2) за геном гемаглютиніну розташувались у 3 генетичних групах субкластеру 3C [127]. A/Ukraine/288/13, A/Ukraine/316/13 і A/Ukraine/391/13 разом з вірусами, виділеними у Росії, Молдові, Болгарії та Японії і мали заміщення T128A (втрата сайту глікозилювання) та R142G. Додатково наші ізоляти, а також штами з Болгарії, Японії та Новосибірська набули

заміщення V347M; і I260M зі штамом A/Novosibirsk/32/2013. A/Ukraine/466/13, A/Khmel'nitsk/350/13 і A/Khmel'nitsky/480/13 разом з ізолятами з В'єтнаму, Валенсії, Туреччини, Барбадосу і Перу селектували заміщення D489N. A/Ukraine/275/13, A/Ukraine/387/13, A/Dnipropetrovsk/361/13, A/Dnipropetrovsk/364/13 і A/Dnipropetrovsk/390/13 розташувались у верхній частині філогенетичного дерева. Всі накопичені мутації були синонімічними і не призвели до зміни амінокислотної послідовності [132].

Аналіз за послідовностями гену нейрамінідази дав схожі результати з аналізом за послідовностями гену гемаглютиніну, за винятком деяких розбіжностей. Усі виділені в епідемічний сезон 2012-2013 ізоляти вірусів грипу А(Н3N2) знаходились в межах кластеру Victoria/208 і були подібними до вакцинного штаму A/Victoria/361/2011. Більшість ізолятів, виділених у Києві і Хмельницькому, були подібними до референс-штамів A/Berlin/93/2011 і A/Hawaii/22/2012 та знаходились у субкластері 3С. Частина вірусів, виділених у Києві і Дніпропетровську, за послідовностями нейрамінідази належали до субкластеру 3А, тоді як за гемаглютиніном — до 3С. Ці ізоляти розташувались у нижній частині філогенетичного дерева і були подібними до референс-штаму A/Stockholm/18/2011. У субкластері 3А заміщень спостерігалось більше. Так всі ізоляти селектували E221D, T238A і S416N. Заміщення I62V і N402D були виявлені у вірусів, ізольованих у Києві, Дніпропетровську і штаму з Норвегії [152].

Віруси грипу А(Н3N2) в сезоні 2013-2014 років належали до кластеру 3С та розділились на 3 підгрупи [143].

Філогенетичний аналіз послідовностей гену гемаглютиніну показав, що віруси субкластеру 3С мали спільні заміщення – S45N, T48I, A198S і N312S.

Ізоляти A/Dnipro/234/2014 і A/Ukraine/6161/2014, ввійшли до першої групи, а останній показав унікальне заміщення A304D (аланін заміщується на аспарагінову кислоту). ізоляти з Дніпропетровська (A/Dnipro/227/2014,

A/Dnipro/229/2014, A/Dnipro/235/2014) та Києва (A/Ukraine/710/2013, A/Ukraine/728/2013) належали до другої групи та несли заміщення A530V. У Дніпропетровських штамів №227 і №229 спостерігалось заміщення A128V, тоді як у вірусів першої групи у 128 положенні знаходилась амінокислота треонін. Третя група містила, як віруси з різних регіонів України, так і штами з різних куточків світу. Ізоляти A/Zhitomir/286/2014 [139], A/Zhitomir/290/2014 і A/Kharkov/201/2014 набули заміщення I214T (ізолейцин заміщувався на треонін).

Результати аналізу послідовностей гену нейрамінідази були тотожними аналізу послідовностей гемаглютиніну. Всі виділені в епідемічний сезон 2013 - 2014 років ізоляти вірусів грипу А(Н3N2) знаходились в межах субкластеру 3С кластеру Victoria/208 і зберегли мутації S367N і K369T, характерні кластеру 3, а також мутації L81P і N402D (втрата сайту глікозилювання [53]), характерні субкластеру 3С.

Штам A/Kharkov/203/2014 з найближчим ізолятом з Норвегії селектував заміщення V396I (валін заміщувався на ізолейцин), та A/Dnipro/234/2014 з заміщенням L338S (лейцин заміщувався на серин) належали до 1 групи. До другої групи ввійшов штам A/Dnipro/227/2014 набув заміщення Q5K (глутамін заміщувався лізином). Ізоляти A/Ukraine/710/2013, A/Ukraine/728/2013 і A/Dnipro/235/2014 несли мутації S44P і P45S і, ймовірно, були результатом одиничного занесення до країни під час епідемії. A/Ukraine/728/2013 також селектував мутацію G40D (глїцин заміщувався аспарагіновою кислотою), а A/Dnipro/235/2014 – K75R (лізин заміщувався аргініном). Ізолят A/Kharkov/203/2014 при аналізі генів гемаглютиніну знаходився в третій групі, а при порівнянні генів нейрамінідази був подібний до вірусів з першої групи.

Віруси грипу А(Н3N2) сезону 2013 – 2014 років хоч і були генетично різноманітними, відносились до домінуючого у світі субкластеру 3С кластеру Victoria/208 і були подібними до вакцинного штаму A/Texas/50/2012.

Починаючи з сезону 2013-2014 з вірусів А(Н3N2) в Україні циркулювали лише ті, що належали до генетичної групи 3С, а циркуляція вірусів групи 3А не спостерігалась. Такі ізоляти виявлялись лише в сезоні 2012-2013 років [139].

Усі виділені в епідемічному сезоні 2014-2015 віруси грипу А(Н3N2) знаходились в межах субкластеру 3С кластеру Victoria/208 і зберегли мутації S367N і K369T, характерні кластеру 3, а також мутації L81P і N402D (втрата сайту глікозилювання), характерні для субкластеру 3С. Найбільш численна група ізолятів, виділених в різних куточках світу, в тому числі й в Україні, розмістилась в субкластері 3С.2 разом з новим вакцинним штамом A/Switzerland/9715293/2013, до якого вони мають високій ступінь подібності - до 75% [53]. Однак, вони набули нових амінокислотних змін, які дозволили виділити їх у три групи - 3С.2а, 3С.3а, 3С.3б. Більшість українських ізолятів належали до групи 3С.2а, яка характеризується тим, що не здатна зв'язувати еритроцити морської свинки. Це, в свою чергу дуже ускладнює їх антигенну характеристику в РГГА. Для вирішення цієї задачі зазвичай використовують інші, більш складні та трудомісткі методи (використання РГГА в присутності озельтамівіру та метод «плаків»).

Віруси грипу В з обох кластерів В/Massachusetts та В/Wisconsin циркулювали одночасно у світі [129].

Частина виділених в Україні вірусів грипу В/Yamagata сезону 2012-2013 років знаходилась у кластері В/Massachusetts, а інша частина була подібна до вакцинного штаму В/Wisconsin/01/2010 [151]. Схожа картина спостерігалась в усьому світі, і призвела до перегляду штамового складу вакцин на сезон 2013-2014 з включенням у їх склад штаму В/Massachusetts/02/2012.

Усі ізоляти кластеру В/Wisconsin несли заміщення S150I і N165Y. Тут розташувалась половина виділених ізолятів у 2008 та 2013 роках, переважно з Києва та Хмельницького [151]. Віруси сезону 2012-2013 років

набули ряд заміщень: T37A, T181K, G229D, K298E і E312K, а група з українськими ізолятами також і Q122K. У межах кластеру В/Massachusetts розташувались ізоляти, виділені у Києві і Дніпропетровську. Частина українських ізолятів селектувала одиничні АК заміщення (N164S у В/Ukraine/5816/13, T75N у В/Ukraine/5897/13, і M251L у В/Ukraine/5940/13).

Аналіз послідовностей гену нейрамінідази повністю корелював з аналізом послідовностей гену гемаглютиніну. Виділені в Україні ізоляти розділились на два генетичні кластери В/Wisconsin/01/2010 і В/Massachusetts/02/2012-подібні.

У сезоні 2013-2014 років обмежені дані не дозволили виявити присутність ізолятів кластеру В/Massachusetts/02/2012 в Україні, хоча ми не виключаємо такої можливості, зважаючи на минулий сезон. Єдиний сиквенований ізолят належав до генетичного кластеру В/Wisconsin. Всі ізоляти кластеру несли заміщення S150I, N165Y і S229D.

За геном нейрамінідази віруси грипу В утворили нову групу вірусів, куди увійшов український ізолят і яка селектувала 24 нові заміщення.

Досліджувані українські ізоляти сезону 2014-2015 років знаходились в межах кластеру В/Wisconsin/01/2010. Українські ізоляти В/Odessa/393/2015, В/Kharkov/266/2015 та В/Ukraine/6449/2015 виокремились в окрему групу і селектували мутацію M251V (метіонін заміщувався валін). Два ізоляти - В/Zaporizha/333/2015 та В/Ukraine/6368/2015 мали унікальне точкове заміщення T519S (треонін заміщувався на серин). Найближче до них розмістився штам В/Wisconsin/14/2015, проте такої мутації він не селектував.

Варто зазначити, що як для поточного сезону, так і для попереднього вакцинним штамом був обраний В/Massachusetts/02/2012, тоді як В/Wisconsin/01/2010 – для минулих сезонів. Незначна кількість ізолятів з інших країн, розташованих в генетичному кластері В/Massachusetts/02/2012, зберегли подібність до вакцинного штаму на

досить низькому рівні (20%). Більшість ізолятів поточного сезону виявили подібність на рівні 80% до В/Phuket/3073/2013, який став новим вакцинним штамом і був включений до складу вакцин на наступний епідемічний сезон 2015-2016.

У сезоні 2012-2013 років за результатами антигенного аналізу всі досліджувані ізоляти вірусів А(Н1N1)рdm09 сезону прореагували у високих титрах до штамоспецифічних сироваток А/California/07/2009 і А/Washington/24/2012. Проте, за результатами антигенного аналізу всі досліджувані віруси мають найбільшу спорідненість до штаму А/California/07/2009(Н1N1), особливо ізоляти А/Ukraine/259/2013 та А/Ukraine/274/2013 мали найвищі титри (1:1280) реагування з цією штамоспецифічною сироваткою [126,127].

Віруси грипу А(Н3N2) за результатами антигенної характеристики мали найбільшу спорідненість до штаму А/Victoria /361/2011, про що свідчить високий титр реагування з сироваткою до цього штаму. Всі досліджувані ізоляти показали високі титри реагування зі штамоспецифічними сироватками А/Victoria /361/2011 та А/Texas/50/2012 [128]. Найвищий титр реагування зі штамоспецифічною сироваткою А/Victoria/361/2011 показали ізоляти А/Ukraine/5491/2012 (1:640), А/Ukraine/387/2013 (1:320) та А/Dnipro/507/2013 (1:320).

Всі досліджувані ізоляти вірусів грипу В прореагували зі штамоспецифічними сироватками В/Wisconsin/01/2010 та В/Massachusetts/02/2012. Результати антигенного аналізу вірусів грипу В показали, що польові ізоляти цього сезону мали найбільшу спорідненість до референс-штаму В/Wisconsin/01/2010, генетичної гілки В/Yamagata, про що свідчить високий титр реагування (1:640) з сироваткою до цього штаму.

В сезоні 2013-2014 років за результатами антигенного аналізу вірусів грипу А(Н1N1)рdm09, виділених в Україні було показано, що польові ізоляти цього сезону мали найбільшу спорідненість до референс-штаму

A/California/07/2009, про що свідчить високий титр реагування з сироваткою до цього штаму.

За результатами антигенного аналізу провідного збудника сезону 2013-2014 віруси грипу А(Н3N2) мали найбільшу спорідненість до референс-штаму A/Texas/50/2012, про що свідчать дані отримані в РГГА (титр реагування з сироваткою до цього штаму 1:2560). Виділені ізоляти у високих титрах прореагували зі штамоспецифічними сироватками A/Texas/50/2012 та A/California/02/2014. Найбільшу спорідненість до референс-штаму мали ізоляти A/Ukraine/84/2014 та A/Dnipro/384/2014, про що свідчить найвищий титр (1:2560) реагування з сироваткою до цього штаму.

Вірус грипу типу В відігравав другорядну роль в сезоні 2013-2014 років та за результатами антигенної характеристики польові ізоляти цього сезону мали спорідненість до референс-штаму B/Massachusetts/02/2012, про що свідчить високий титр (1:320) реагування з сироваткою до цього штаму. Антигенний аналіз показав, що всі віруси грипу В сезону 2013-2014 років прореагували в високих титрах зі штамоспецифічними сироватками B/Brisbane/36/2012 та B/Massachusetts/02/2012 [129]. Найвищий титр реагування (1:320) з сироваткою B/Brisbane/36/2012 проявили ізоляти B/Dnipro/313/2014 та B/Dnipro/338/2014.

У сезоні 2014-2015 років за результатами антигенного аналізу провідного збудника сезону віруси грипу В мали найбільшу спорідненість до референс-штаму B/Phuket/3073/2013, про що свідчать дані отримані в РГГА (титр реагування з сироваткою до цього штаму 1:1280). За результатами антигенного аналізу, віруси грипу В у високих титрах прореагували зі штамоспецифічними сироватками B/Massachusetts/02/2012, B/Phuket/3073/2013 та B/Hong Kong/3417/2014. Найвищий титр реагування (1:640) з сироваткою B/Massachusetts/02/2012 проявили ізоляти B/Zaporizza/339/2015, B/Odessa/390/2015 та B/Kharkov/263/2015.

Віруси грипу А(Н3N2), за результатами антигенної характеристики, мали найбільшу спорідненість до штаму A/Switzerland/9715293/2013, про що свідчить високий титр реагування (1:640) з сироваткою до цього штаму. Антигенний аналіз показав, що віруси грипу А(Н3N2) прореагували зі штамоспецифічними сироватками А/Texas/50/2012, A/Switzerland/9715293/2013 та A/Stockholm/6/2014. Найвищий титра реагування (1:320) з сироваткою А/Texas/50/2012 проявили ізоляти А/Ukraine/165/2015 та А/Ukraine/501/2015.

За результатами антигенного аналізу провідного збудника сезону 2014-2015 років віруси грипу А(Н1N1)pdm09 мали найбільшу спорідненість до референс-штаму A/California/7/2009(Н1N1), про що свідчать дані отримані в РГГА (титр реагування з сироваткою до цього штаму 1:1280). В результаті антигенного аналізу було показано, що досліджувані ізоляти у високих титрах прореагували з штамоспецифічними сироватками А/California/7/2009, А/Hong Kong/5659/2012 та А/South Africa/3626/2013, що говорить про їх високу антигенну спорідненість. Найвищий титр реагування (1:2560) зі штамоспецифічною сироваткою А/California/7/2009 проявили ізоляти А/Khmelnytsky/471/2015 та А/Ukraine/277/2015.

Антигенні властивості більшості вірусів грипу А(Н1N1)pdm09 за весь досліджуваний період залишались відносно однорідними. Відмінності у вірусах, виявлені в РГГА при взаємодії їх з сироватками, свідчать про поступову зміну антигенних властивостей пандемічних вірусів.

Віруси грипу А(Н3N2) та віруси грипу В проявляли значно більшу антигенну варіацію, як видно з зміни антигенної спорідненості протягом 2012-2015 років.

Аналіз спектру антигенних варіантів вірусу грипу, що мали епідемічну значимість, ілюструють гетерогенність антигенних властивостей гемаглютиніна ізолятів, що циркулювали.

ВИСНОВКИ

В дисертації була вирішена науково-практична задача - досліджена мінливість вірусів грипу за антигенними та генетичними характеристиками із застосуванням філогенетичного аналізу для оцінки гетерогенності їх популяції (з 2012 по 2015 роки), що дозволяє проводити якісне етіологічне прогнозування епідемій грипу в Україні, яке сприяє вчасному прийняттю управлінських та організаційних рішень. Основні результати представлені у висновках:

1. Протягом епідемічних сезонів грипу 2012-2015 років зареєстрована одночасна циркуляція генетичних варіантів трьох збудників грипу – А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) та В генетичної гілки В/Yamagata у різному відсотковому співвідношенні. Так вірус грипу А(Н1N1)pdm09 грав ключову роль в епідемічному процесі 2012-2013 років, де його відсоткова частка становила $(45,6 \pm 3,3)$ %. В сезоні 2013-2014 років вірус грипу А(Н3N2) переважав та склав $(73,3 \pm 3,4)$ %. Віруси грипу В переважали у 2014-2015 роках, їх відсоткова частка становила $(64,2 \pm 2,9)$ %. Таким чином, щосезону відбувалась зміна провідного збудника епідемії.
2. Встановлено, що українські ізоляти (Н1N1)pdm09 протягом всіх трьох сезонів зберегли антигенну спорідненість з референс-штамом А/California/07/2009 та залишались антигенно однорідними, що говорить про їх низьку антигенну мінливість.
3. У вірусів грипу А(Н3N2) спостерігалась висока антигенна мінливість. Протягом трьох сезонів вони належали до різних референс-штамів: А/Victoria/361/2011 (2012-2013 роках), А/Texas/50/2012 (2013-2014 роках) та А/Switzerland/9715293/2013(2014-2015 роках). Лише частина вірусів в сезоні 2012-2013 років за послідовностями нейрамінідази належали до субкластеру 3А, тоді як за гемаглютиніном — до 3С. Надалі циркуляції вірусів, які належать до субкластеру 3А, на території України не спостерігалось.

4. Всі досліджувані ізоляти сезону 2014-2015 років розташувались у субкластері 3С кластеру A/Victoria/208/2009, а за набутими новими амінокислотними замінами в гемаглютиніні були розподілені на три групи: 3С.2а, 3С.3а, 3С.3б. Більшість ізолятів, виділених в Україні, належали до групи 3С.2а, яка характеризується нездатністю аглютинувати еритроцити, що викликає складності при вивченні їх антигенних властивостей.

5. Показано, що віруси грипу типу В генетичної гілки В/Yamagata кожного року змінювались, що дозволяло віднести їх до різних референс-штамів. В 2012-2013 роках спостерігалась їх найбільша антигенна спорідненість до штаму В/Wisconsin /01/2010, в 2013-2014 роках - до В/Massachusetts/02/2012, а в сезоні 2014-2015 років – до В/Phuket/3073/2013, що свідчить про постійну зміну їх антигенних властивостей.

6. В результаті аналізу амінокислотних заміщень у послідовностях НА були виявлені нові заміщення A256T, K163Q та закріплення їх у популяції вірусів A(H1N1)pdm09, що свідчить про поширення вірусів групи 6В. Для вірусів грипу A(H3N2) була характерна поява заміщень, які призвели до набуття потенційних сайтів глікозилування (Q33R, N278K, N145S) та могли надати вірусам більшого захисту від імунної відповіді організму людини. З 2013-2014 років у ізолятів A(H3N2) виникло нове заміщення R142G, яке спостерігалось у деяких українських ізолятів двох сезонів і зумовлювало зміну заряду амінокислотного залишку, що могло вплинути на зміну антигенних властивостей. В сезоні 2012-2013 років віруси грипу В належали до генетичних кластерів В/Massachusetts/02 з заміщеннями (R48K, P108A, T181A) та В/Wisconsin/01, а у двох наступних сезонах - тільки до В/Wisconsin/01 з заміщеннями (K88R, D196N).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Paul J. Jannetto. Real-Time Detection of in Influenza A, Influenza B, and Respiratory Syncytial Virus A and B in Respiratory Spesimens by Use of Nanoparticle Probes / Paul J. Jannetto, Blake W. Buchan, Kimberly A. Vaughan, Joellen S. Ledford, Dennis K. Anderson, Donald C. Henley, Neil B. Quigley, Nathan A. Ledebroe // *Journal of clinical microbiology*. Nov. - 2010, P. 3997-4002.
2. Міроненко А. П. Підсумки епідемічного сезону грипу 2014-2015 років в Україні / Міроненко А.П., Голубка О.С., Онищенко О.В., Радченко Л.В., Фесенко А.Ю., Хмельницька Г.С., Лейбенко Л.В., Смутько О.Ю. // *Профілактична медицина* 2016. № 1-2 (26) С. 6-21.
3. Дзюблик І.В. Грип та його профілактика: Навчальний посібник /за ред. Дзюблик І.В., Широбокова В.П. – К., 2005. – 194 с.
4. Nelson M., The evolution of epidemic influenza/Nelson M., Holmes E.//*Nature*. – 2007. – Vol.8. – P.196-205.
5. Palese P., Orthomyxoviridae: The viruses and their replication/ Palese P., Shaw M.L.//*In Fields Virology*. – 2007. P.1647–1689.
6. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committe on Taxonomy of Viruses / King M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. [et al.] – London: Academic Press. – 2011. – P. 749–758.
7. Гайдаш І.С. Медична вірологія / Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. // *Медична вірологія*. за ред. Казимірко Н.К. – Л.,2002. С. 252.
8. Андрійчук О.М. Вірусні інфекції людини та тварин: епідеміологія, патогенез, особливості противірусного імунітету, терапія та профілактика / Андрійчук О.М., Коротєєва Г.В., Молчанець О.В., Харіна А.В.// *Навчальний посібник* – Київ: - 2012. С. 484.
9. Tong S. New world bats harbor diverse influenza A viruses /Tong S., Zhu X., Li Y. et al. // *PLoS Pathog*. – 2013. – V. 9. – P. e1003657.

10. White J.M., Attachment and entry of influenza virus into host cells. Pivotal roles of hemagglutinin/ White J.M., Hoffman L.R., Arevalo J.H., et al.// *Structural Biology of Viruses*. – 1997. – P.80–104.
11. Laver W.G. Crystallisation and peptide maps of neuraminidase heads from H2N2 and H3N2 influenza virus strains. / Laver W.G. // *Virology*. – 1978. – Vol.86. – P. 87-98.
12. Nguyen H.T., Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods./ Nguyen H.T., Fry A.M., Gubareva L.V.// *Antivir.Ther.* – 2012. – Vol.17. – P.159 – 173.
13. Zhirnov O. P. Interaction of Influenza A Virus M1 Matrix Protein with Caspases / Zhirnov O. P., Ksenofontov A. L., Kuzmina S. G., Klenk H. D. // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 67(5). – P. 534–539.
14. Гриневич О.Й. Грип H1N1: уроки пандемії / Гриневич О.Й., І.Г. Маркович // *Укр. Мед. Часопис*. – 2010. – № 5 (79). – С. 28–32.
15. Zebedee S.L. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions / Zebedee S.L., Lamb R.A. // *J Virol*. – 1988. – 62. – P. 2762–2772.
16. Tompkins S.M. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1 / Tompkins S.M., Zhao Z.S., Lo C.Y. et al. // *Emerg Infect Dis*. – 2007. – 13(3). – P. 426–435.
17. Williams M.A. Determination of the orientation of an integral membrane protein and sites of glycosylation by oligonucleotide-directed mutagenesis: influenza B virus NB glycoprotein lacks a cleavable signal sequence and has an extracellular NH2-terminal region / Williams M.A., Lamb R.A. // *Mol Cell Biol*. – 1986. – 6(12). – P. 4317-4328.
18. Wolfgang B. F. Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design // *Protein Reviews*. – 2005. – 1. – P. 222–223.
19. Kobayashi M. Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase / Kobayashi M., Toyoda T., Ishihama A. // *Arch Virol*. – 1996. – V. 141(3-4). – P. 525–539.

20. Perez D.R. Functional Analysis of PA Binding by Influenza A Virus PB1: Effects on Polymerase Activity and Viral Infectivity / Perez D.R., Donis R.O. // *J Virol.* – 2001. – V. 75(17). – P. 8127–8136.
21. Klumpp K. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure / Klumpp K., Ruigrok R.W.H., Baudin F. // *EMBO Journal.* – 1997. – V.16. – P. 1248–1257.
22. Portela A. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication / Portela A., Digard P. // *J Gen Virol.* – 2002. – V. 83(4). P. 723–734.
23. Lin D. Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus / Lin D., Lan J., Zhang Z. // *Acta Biochim Biophys Sin.* – 2007. – 39(3). – P. 155–162.
24. Hatada E. Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs / Hatada E., Saito S., Okishio N., Fukuda R. // *Journal of General Virology.* – 1997. – 78. P. 1059–1063.
25. Ehrhardt C. et al. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses // *Journal of General Virology.* – 2007. – Vol. 81. – P. 3058–3067.
26. Hay A.J. Antigenic and genetic characterization of current influenza strains / Hay A.J., Gregory V., Douglas A.R., Lin Y.P. // *Eur. J. Epidemiol.* – 1994. – V. 10. – P. 465-466.
27. Kuiken T. Public Health. Pathogen surveillance in animals / Kuiken T., Leighton F.A., Fouchier R.A. et al. // *Science.* – 2005. – V. 309. – P. 1680-1681.
28. Taubenberger J.K. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation / Taubenberger J.K., Kash J.C. // *Cell Host&Microbe.* – 2010. – 7(6). P. 440–451.
29. Slepushkin V.A., Infection of human airway epithelia with H1N1, H2N2, and H3N2 influenza A virus strains. / Slepushkin V.A., Staber P.D., Wang G. // *Mol Ther.* – 2001. – Vol.3. – P.395-402.

30. Nerome, R. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism/ Nerome, R., Y. Hiromoto, S. Sugita, N. Tanabe, M. Ishida, M. Matsumoto, S. E. Lindstrom, T. Takahashi, and K. Nerome. // Arch. Virol. –2001. – V.143. – P.1569-1583.
31. Taubenberger J. The pathology of influenza virus infections / Taubenberger J., Morens D. // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. – 2008. – V.3. – P. 499-522.
32. Monto A.S. History and epidemiological features of pandemic influenza. / Monto A.S., Sellwood C. – In: Pandemic Influenza, 2nd ed. / Ed. Van-Tam J., Sellwood C. – CAB International. – 2013. – P. 234.
33. Gordon S. Avian influenza: a wake-up call from birds to humans // Cleve Clin J Med. – 2004. – 71, N 4. – P. 273–274.
34. http://www.hokudai.ac.jp/bureau/populi/edition34/littera34e_pdf/littera34e_30_33.pdf
35. Liu Y. Phylogenetic diversity and genotypic complexity of H1N1 subtype swine influenza viruses isolated in Mainland China/Liu Y., Wang J., Ji J. //Virology Journal. – 2012. – Vol.9. – P.289.
36. Bush R.M. Predicting influenza evolution: the impact of terminal and egg-adapted mutations / Bush R.M., Fitch W.M., Smith C.B. et al. // Excerpta Medica. International Congress Series. – 2001. – Vol. 1219. – P. 147–153.
37. Enami M. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus (negative-sense virus/rescue of synthetic RNA/viral selection system) / Enami M., Luytjes W., Krystal M., Paleset. P. // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87. – P. 3802–3805.
38. Zimmer S.M., Burke D.S. Historical Perspective — Emergence of Influenza A (H1N1) Viruses.- N Engl J Med. – 2009. – Vol. 361. – P. 279–285.
39. Garten R. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans / Garten R., Davis T.C., Russell C.A. et al. // Science. – 2009. – V. 325. – P. 197-201.

40. Zhu H. History of swine influenza in Asia / Zhu H., Webby R., Lam T.T.Y. et al. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. – V. 370. – P. 57-68.
41. Choi Y.K. Swine influenza viruses: an Asian perspective / Choi Y.K., Pascua P.N.Q., Song M.-S. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2013. – V. 370. – P. 141-147.
42. Nicholson K.G. Textbook of influenza / Nicholson K.G., Webster R. G., Hay A. J. // Blackwell Science. – 1998. – P. 578.
43. Klenk H.-D. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment / Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blodorn J. // *Virology.*–1975. – Vol. 68(2). –P. 426–439.
44. Liang Y. Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments / Liang Y., Huang T., Ly H., Parslow T.G. // *Journal Virology* – 2008. – 82. – P. 229 –236.
45. Barr I.G, Epidemi-ological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1),A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 Northern Hemi-sphere season/ Barr I.G, McCauley J., Cox N., Daniels R., Engelhardt O.G., Fukuda K., et al.//*Vaccine.* – 2010. – Vol.28(Feb (5)). – P.1156–1167.
46. Gamblin S.J. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins / Gamblin S.J., Skehel J.J. // *The Journal of biological chemistry* 2010. – V.285.– N.37. – P. 28403 – 28409.
47. Klenk H.-D. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment / Klenk H.-D., Rott R., Orlich M., Blodorn J. // *Virology.*–1975. – Vol. 68(2). –P. 426–439.
48. Zhu-Nan L. The mechanism and inhibition of influenza virus entry / Zhu-Nan L., David A.S. // *The journal of viral entry.* – 2006. – Vol. 2. – № 2. – P. 57–66.

49. Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med.* – 2010. – V. 362. – P. 1708–1719.
50. Rott R. The significance of influenza virus neuraminidase in immunity / Rott R., Becht H., Orlich M. // *J Gen Virol.* – 1974. – 22(1). – P. 35–41.
51. Христофоров Ю.П. Антигенная изменчивость вируса гриппа и структура вирусных популяций / Христофоров Ю.П., Фучижи И.С., Закусило В.Н. // Тезисы. докл. XI Укр. съезда микр., эпидем. и параз. – Киев. – 1985. – Часть 1. – С. 98.
52. Gorman O.T. Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis / Gorman O.T., Bean W.J., Webster R.G. // *Microbiol. Immunol.* – 1992. – V. 176. – P. 75-97.
53. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report February 2014. [электронный ресурс] URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Feb2014-web.pdf>
54. Nelson M.I. The evolution of epidemic influenza / Nelson M.I., Holmes E.C. // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – V.8. – P. 196-205.
55. Генетика вирусов гриппа: Пер с англ./ Под ред. Пейлиза П. и Кингсбери Д. – Москва: Медицина. – 1986. – 336 с.
56. Han L. Evolutionary characteristics of swine-origin H1N1 influenza virus that infected humans from sporadic to pandemic / Han L., Lu W., Han Y. et al. // *Journal of Public Health and Epidemiology.* – 2011. – 3, N 6. – P. 254–270.
57. Fujii Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions / Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T., Kawaoka Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100(4). – P. 2002–2007.
58. Lamb R.A. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for

overlapping proteins / Lamb R.A., Lai C.J., Choppin P.W. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1981. – 78 (7). – P. 4170–4174.

59. Shaw M.W. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase / Shaw M.W., Choppin P.W., Lamb R.A. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1983. – 80(16). – P. 4879–4883.

60. Chen R. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics / Chen R., Holmes E.C. // Mol Biol Evol. – 2006. – 23(12). – P. 2336–2341.

61. Nelson M.I. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918 / Nelson M.I., Viboud C, Simonsen L. et al. // PLoS. – 2008. – Vol. 4(2). – P. 100–112.

62. Danishuddin M. Phylogenetic analysis of surface proteins of novel H1N1 virus isolated from 2009 pandemic / Danishuddin M., Khan S., Khan A. // Bioinformation. – 2009. – 4, N 2. – P. 94–97.

63. Layne S.P. Pandemic influenza: an inconvenient mutation / Layne S.P., Monto A.S., Taubenberger J.K. // Science. – 2009. – Vol. 323. – P. 1560–1561.

64. Kilander A., Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza AH1N1 virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010/Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. //Eurosurveillance. – 2010. – Vol.15. – P.19498.

65. Glinsky G.V. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations / G.V. Glinsky // Cell Cycle. – 2010. – V. 9. – P. 958–970.

66. Jimenez-Alberto A. Analysis of adaptation mutants in the hemagglutinin of the influenza A(H1N1)pdm09 virus / A. Jimenez-Alberto, E. Alvarado-Facundo, R.M. Ribas-Aparcio, J.A. Castelan-Vega // PLoS One. – 2013. – V. 8. – P. 70005.

67. WHO Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. – 2011. – WHO. – 139 p. [электронный ресурс] URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf
68. Von Itzstein M. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication / Von Itzstein M., Wu W.Y., Kok G.B. et al. // Nature. – 1993. – №363. – P. 418–423.
69. Kim C.U. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity / Kim C.U., Lew W., William M.A. et al. // J. Am. Chem. Soc. – 1997. – 119. – P. 681–690.
70. Martin K. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import / Martin K., Helenius A. // Cell. – 1991. – 67. – P. 117–130.
71. Pielaka R.M. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel / Pielaka R.M., Schnellc J.R., Choua J.J. // Pnas. – 2009. – V.106 (18). – P. 7379–7384.
72. Жилинская И. Н. Влияние гемагглютиниона вируса гриппа на эритроциты и тромбоциты / Жилинская И. Н., Деркачев Э.Ф., Ляпина Л.А. и др. // Известия Академии Наук. Серия биологическая. - 1999. - №3. - С.355-358.
73. Wolfgang B. F. Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design // Protein Reviews. – 2005. – 1. – P. 222–223.
74. MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells/ D.Y. Oh, I.G. Barr, J.A. Mosse et al./ Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – V.46, № 7. – P. 2189-2194.
75. Zambon M.C. Molecular methods for diagnosis of influenza / Zambon M.C., Ellis J.S. // Materials of international congress on Options for the control of influenza IV. — Excerta Medica, 2001. – P.267-273.

76. Вирусы гриппа и грипп / Под ред. Кильбурна Э.Д. - М.: Медицина, 1978. - 588 с.
77. Allander T. Cloning of human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples / Allander T., Tammi M.T., Eriksson M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2005. - Vol. 102. - P. 12891 - 12896.
78. Посібник з медичної вірусології За редакцією академіка Академії наук вищої школи України професора Гиріна В. М. – К.: «Здоров'я», 1995. – 366 с.
79. Грипп: Руководство Под редакцией профессора Карпухина Г. И. — Ленинград: Медицина, 1986. – 352 с.
80. Петров Р.В. Оценка иммунной системы при массовых обследованиях / Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. и др Методические рекомендации // Иммунология. – 1992. - №6. – С. 51-62.
81. Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J. Textbook of influenza. — Blackwell Science, 1998. – pp 578.
82. Moeller M.R. Development and evaluation of immunochromatographic rapid tests for screening of cannabinoids, cocaine, and opiates in urine/ M.R. Moeller, J.M. Haguenoer // J. Anal. Toxicol. – 1998.- V.22 – P. 148-155.
83. Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay / T.M. Chambers, K.F. Shortridge, P.H. Li et al.// The Veterinary Record.- 1994.- V.135.- №12.- P.275-279.
84. Ryan-Poirier K.A. Application of Directigen Flu-A for the detection of influenza A virus in human and nonhuman specimens/ K.A. Ryan-Poirier, J.M. Katz, R.G. Webster // Journal of Clinical Microbiology.- 1992.- V. 30.- P.1072-1075.
85. Comparison of Directigen RSV with viral isolation and direct immunofluorescence for the identification of respiratory syncytial virus/ J.L. Waner, N.J. Whitehurst, S.J. Todd et al.// Journal of Clinical Microbiology.- 1990.- V. 28.- P.480-483.

86. Comparison of Directigen Flu-A with viral isolation and direct immunofluorescence for the rapid detection and identification of influenza A virus/ J.L. Waner, S.J. Todd, H. Shalaby et al.// *Journal of Clinical Microbiology*.- 1991.- V. 29.- P.479-482.

87. Prescription of anti-influenza drugs for healthy adults: a systematic review and meta-analysis/ J. Burch, M. Corbett, C. Stock et al.//*The Lancet Infectious Diseases*.- 2009.- V.9.- №9.- P.537-545.

88. Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasispecies/ A. Lackenby, J. Democratis, M.M. Siqueira et al.// *Antiviral Therapy*.- 2008.- V.13.- № 6.- P.809-820.

89. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008/ T.G. Sheu, M. Varough, V.M. Deyde et al.// *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.- 2008.- V.52.- № 9.- P.3284-3292.

90. Evaluation of Neuraminidase Enzyme Assays Using Different Substrates to Measure Susceptibility of Influenza Virus Clinical Isolates to Neuraminidase Inhibitors: Report of the Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network/ Wetherall N.T., Trivedi T., J. Zeller et al.// *Journal of Clinical Microbiology*.- 2003.- V. 41.- P.742-750.

91. Spada B. Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and children/ B. Spada // *Journal of Virological Methods*.-1991.- V. 33.- P.305-310.

92. Zambon M. Position statement: global neuraminidase inhibitor susceptibility network / M. Zambon, F.J. Hayden// *Antiviral Research*.- 2001.- V. 49.- P.147-156.

93. Uyeki T. Influenza diagnosis and treatment in children. A review of studies on clinically useful tests and antiviral treatment for influenza/ Uyeki T.// *The Pediatric Infectious Disease Journal*.- 2003.- V.22.- P.164-177.

94. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1) 2009: www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html .
95. Good laboratory practice when performing molecular amplification assays: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/qsop/pdf/qsop38.pdf>.
96. Watson J.D. Molecular structure of nucleic acids/ J.D. Watson, F.H.C. Crick // Nature.- 1953.- V.- 171.- P. 738-740.
97. Кильбурн, Е.Д. Вирусы гриппа и грипп/ Е.Д. Кильбурн. –М.: Медицина.- 1978. – 588 с.
98. Rapid identification of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses with H274Y mutation by RT-PCR/restriction fragment length polymorphism assay/ L. Guo, R.J. Garten, A.S. Foust et al.// Antiviral Research.-2009.- V.82.- №1.-P.29-33.
99. Wang R. Methods for molecular surveillance of influenza/ R. Wang, J.K. Taubenberger// Expert Review of Anti-Infective Therapy.-2010.- №8.- P.517-527.
100. Maternal morbidity and perinatal outcomes among pregnant women with respiratory hospitalizations during influenza season/ T.V. Hartert, K.M. Neuzil, A.K. Shintani et al.// American Journal of Obstetrics & Gynecology.- 2003.- V. 189.- № 6.- P.1705-1712.
101. Progress report antibodies task group/ B. Schweiger, L. Brydak, A. Hay et al.// Presentation on Annual meeting of European Influenza Surveillance Scheme .- Malta, St.-Julian.-May 2006.
102. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study/ E. Miller, K. Hoschler, P. Hardelid et al.// The Lancet.- 2010.- V.375.- № 9720.- P.1100-1108.
103. Рекомендації Світового Центру грипу в Атланті, США щодо використання в практиці вірусологічних лабораторій культури клітин з метою виділення вірусів грипу. – 1997. – 10 с.

104. Zambon M. Position statement: global neuraminidase inhibitor susceptibility network/ M. Zambon, F.J. Hayden // *Antiviral Research.*- 2001.- V. 49.- P.147-156.

105. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses: Memorandum from a WHO meeting// *Bulletin of the World Health Organization: WHO.*- 1992.- V. 70.- P.699-703.

106. Міроненко А.П. Використання швидких тестів на грип у вірусологічній практиці / А.П. Міроненко, І.В. Дзюблик, С.Г. Вороненко // *Лабораторна діагностика.* – 2007 - № 3 (41). - С. 39-42.

107. Diagnosis of influenza in the community. Relationship of clinical diagnosis of confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza/ M. Zambon, J. Hays, A. Webster et al. // *Archives of Internal Medicine.*- V.161.- P.2116-2122.

108. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays/ T. Rowe, R.A. Abernathy, J. Hu-Primmer et al.// *Journal of Clinical Microbiology.*- 1999.- V. 37.- P.937-943.

109. Spada B. Comparison of rapid immunofluorescence assay to cell culture isolation for the detection of influenza A and B viruses in nasopharyngeal secretions from infants and children/ B. Spada // *Journal of Virological Methods.*-1991.- V. 33.- P.305-310.

110. Nicholson, K.G. Textbook of influenza / K.G. Nicholson, R.G. Webster, A.J. Hay. — Blackwell Science.- 1998. – 578 P.

111. Оценка иммунной системы при массовых обследованиях/ Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин и др.// *Иммунология.* — 1992. – №6. – С. 51-62.

112. Фролов, А.Ф. Практическая вирусология / А.Ф. Фролов, Л.Ф. Шевченко, В.П. Ширококов. — К.: Здоровье, 1988. – 243 с.

113. WHO. CDC protocol of realtime RT-PCR for swine influenza A(H1N1) revision 1. April 2009. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/index.html>.

114. Comparison of Directigen Flu-A with viral isolation and direct immunofluorescence for the rapid detection and identification of influenza A virus/ J.L. Waner, S.J. Todd, H. Shalaby et al.// *Journal of Clinical Microbiology*.- 1991.- V. 29.- P.479-482.

115. Бурцева Е.И. и др. Свойства вирусов гриппа А и В, выделенных в куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK // *Вопросы вирусологии* – 2001. - № 1. – С. 29-33.

116. Гураль А. Реалізація системи епідагляду за інфекційними хворобами/ А.Гураль, Т.Сергеєва // *СЕС профілактична медицина*.– 2011.- №1. – С. 12.

117. Порівняльна характеристика сезонних епідемій грипу останнього десятиліття та пандемічного підйому 2009–2010 рр. в Україні/ С.І. Доан, А.П. Міроненко, О.С.Голубка та ін. // *Профілактична медицина*. – 2010. – №4(12). – С. 19–22.

118. Филогенетический анализ. Краткий курс лекций / Рева. О.Н. – К.: КНУ им. Шевченка. – 2009. – С. 38.

119. Бутвиловский, А. В. Базисные методы молекулярной эволюции : учеб.-метод. пособие / А. В. Бутвиловский, Е. В Барковский, В. Э. Бутвиловский. Минск: БГМУ, 2006. – 36 с.

120. Tamura K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. // *Mol Biol Evol*. – 2011. – 28, N 10. – P. 2731–2739.

121. Saitou N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees / Saitou N., Nei M. // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – 4, N 4. – P. 406–425.

122. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // *J. Mol. Evol*. – 1980. – №16. – P. 111-120.

123. Felsenstein J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading / J. Felsenstein // *Syst. Zool.* – 1978. – № 27. – P. 401–410.

124. Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хромов И.Н. Биометрия. Под ред. Тихомировой М. М. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 264 с.

125. Лейбенко Л.В., Міроненко А.П., Хмельницька Г.С., [та ін.]. Філогенетичний аналіз вірусів грипу, виділених в епідемічних сезонах 2006-2007 та 2007-2008 рр. // Тези доповідей XII з'їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. – Ужгород. – 2009. – С. 444.

126. A. Myronenko. Influenza sentinel surveillance in Ukraine and characteristics of isolates during the season 2012 – 2013 / A. Myronenko, O. Onyshchenko, O. Holubka, L.Leibenko, L .Radchenko, S.Babii. / *Abstracts, Options for the control of influenza, Cape Town.* – 2013. – P.638.

127. А.П. Міроненко. Дозорний епіднадгляд за грипом в Україні та характеристики ізолятів сезону 2012-2013рр. / А.П. Міроненко, О.В. Онищенко, О.С. Голубка, Л.В. Лейбенко. Л.В. Радченко, А.Ю. Фесенко, С.В. Бабій // Науково – практична конференція «Інфекційні хвороби : невирішені проблеми (діагностика, етіопатогенетичні особливості, лікування, профілактика)». – 2013. – С. 69-70.

128. Березіна Л.В., Визначення противірусної дії низькоінтенсивного лазерного опромінення на моделі чутливих клітин та вірусу грипу. / Березіна Л.В., Фільчаков І.В. Міроненко А.П., Войцехович В.С., Холін В.В., Радченко Л.В. // Журнал « Фотобіологія та фотомедицина» № 1,2, 2014. – С. 59-63.

129. Caini S. The Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. / Caini S, Huang QS, Ciblak M, Kuszniertz G, Owen R, Wangchuk S, Henriques C, Njouom R, Fasce R, Yu H, Feng L, Zambon M, Clara A, Kosasih H, Puzelli S, Kadio H, Emukule

G, Heraud J-M, Li Wei Ang, Venter M, Mironenko A, Brammer L, Mai le TQ, Schellevis F, /Influenza and other Respiratory Viruses.2014. P. 3-12.

130. Nadezhda M.Zholobak .Cerium dioxide nanoparticles increase immunogenicity of the influenza vaccine. / Nadezhda M.Zholobak, Alla P. Mironenko, Alexander B. Shcherbakov, Olga A.Shydlovska, Mykola Ya.Spivak, Larysa V. Radchenko, Andrey I. Marinin, Olga S. Ivanova, Alexander E. Baranchikov, Vladimir K.Ivanov. / Antiviral Research 127 (2016) 1-9.

131. Williams M.A. Determination of the orientation of an integral membrane protein and sites of glycosylation by oligonucleotide-directed mutagenesis: influenza B virus NB glycoprotein lacks a cleavable signal sequence and has an extracellular NH₂-terminal region / Williams M.A., Lamb R.A. // Mol Cell Biol. – 1986. – 6(12). – P. 4317-4328.

132. Лейбенко Л.В. Филогенетический анализ вирусов гриппа людей типа А сезона 2012-2013гг. в Украине / Лейбенко Л.В., Голубка О.С., Онищенко О.В., Радченко Л.В., Фесенко А.Ю., Бабій С.В., Міроненко А.П / Молекулярная диагностика 2014. Сборник трудов VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том 1, Москва , 2014. – С. 348-349.

133. Yasuda J. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix / Yasuda J., Nakada S., Kato A., Toyoda T. Ishihama A. // Virology. – 1993. – 196. – P. 249–255.

134. <http://platform.gisaid.org/epi3/start>

135. Layne S.P. Pandemic influenza: an inconvenient mutation / Layne S.P., Monto A.S., Taubenberger J.K. // Science. – 2009. – Vol. 323. – P. 1560–1561.

136. Leibenko L.V. Phylogenetic analyses of influenza A(H1N1)pdm viruses isolated in Ukraine during the 2009-2010 pandemic season / Leibenko L.V., Polishchuk V.P., Mironenko A.P. // Biopolymers and Cell. – 2013. –Vol. 29. – N 2. – P. 143–149.

137. Лейбенко Л.В., Філогенетичний аналіз вірусів грипу людей А(Н3N2), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011-2012 років / Лейбенко Л.В., Поліщук В.П., Радченко Л.В., Міроненко А.П. // Журнал «Мікробіологія і біотехнологія». – 2013. - №1(21).- С. 37-47.

138. A. Mironenko ., Phylogenetic analysis of A(H3N2) influenza viruses circulating in Ukraine during 2008-2012 years /A. Mironenko, L. Leibenko, O. Onyshchenko , O Holubka, L. Radchenko // Options VIII for the Control of influenza, 5-10 September, 2013. –Cape Town, South Africa. – P. 174.

139. O.G. Boyalska . Phylogenetic analysis of influenza A viruse (H3N2) circulating in Zhytomyr region during 2013-2014 epidemic season / O.G. Boyalska, I.M. Kyrychuk, I. G. Budzanivska, A.P. Mironenko, L.V. Radchenko, O.Yu. Smutko // Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31. N 3. – P. 226-232.

140. С.Бабій. Адаптивні властивості виділених в Україні вірусів грипу в умовах обмеженого використання протівірусних препаратів / С.Бабій, Л.Радченко, А.Фесенко, О.Смутько , Д.Степанський, А.Міроненко // Вісник ХНУ імені В.Н. Каразіна, серія «Біологія». – 2015, № 1153 (24). – С.125-130.

141. Eshaghi A. Genetic characterization of seasonal influenza A (H3N2) viruses in Ontario during 2010–2011 influenza season: high prevalence of mutations at antigenic sites / Eshaghi A., Duvvuri V.R., Li A., Patel S.N., Basti. et all // Influenza and Other Respiratory Viruses.- V. 8(2), P. 250–257.

142. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013 southern hemisphere influenza season. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201209_recommendation.pdf

143. S.V. Babii. Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of influenza A(H3N2) viruses isolated in Ukraine in 2013 – 2014 season. / S.V. Babii , L.V. Leibenko , A.Yu. Fesenko , L.V. Radchenko , O.Yu. Smutko, O.G. Boyalska,

A.P. Mironenko // The Journal «Microbiology and Biotechnology» of Odesa National Mechnycov University. – 2015. – V. 2(30). – P.20-26.

144. Castilla J. Vaccine effectiveness in preventing laboratory-confirmed influenza in Navarre, Spain: 2013/14 mid-season analysis / Castilla J., Martínez-Bazl I., Navascués A. et al // *Eurosurveillance*. – V. 19 (6).

145. Genetic mutations in influenza H3N2 viruses from a 2012 epidemic in Southern China / J. Zhong, L. Liang, P. Huang et al // *Virology Journal*. – 2013. – V.10. - P: 345-352.

146. Бояльська О.Г., Вирусологический надзор за гриппом и другими ОРВИ в Житомирской области. / Бояльська О.Г., Киричук И.М., Мироненко А.П., Радченко Л.В. // *Вісник проблем біології і медицини*. Випуск 2, том 3 (120) 2015. – С. 95 – 99.

147. Jackson D. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era / Jackson D., Elderfield A., Barclay S. // *J Gen Virol*. – 2011. – V. 92(1). – P. 1-17.

148. Lin P. Recent changes among human influenza viruses / Lin P., Gregory V., Bennett M., Hay A. // *Virus Res*. – 2004. – V.103. – P. 47–52.

149. Chen R. The Evolutionary Dynamics of Human Influenza B Virus / Chen R., Holmes C. // *J Mol Evol*. – 2008. – V. 66(6). – P. 655–663.

150. Лейбенко Л.В., Генетичне різноманіття вірусів грипу гілки B/VICTORIA, виділених в Україні у 2008-2012 роках. / Лейбенко Л.В., Онищенко О.В., Голубка О.С., Радченко Л.В., Бабій С.В., Міроненко А.П. / Тези на XIII з'їзд ТМУ ім.С.М. Виноградського. – 2013. – с.458.

151. L.Leibenko, Phylogenetic analysis of B/Victoria – like influenza viruses isolated in 2008 – 2012 in Ukraine / L.Leibenko, S.Babii, L.Radchenko, O.Smutko // *The Journal of Taras Shevchenko National University of Kiev, Series: biology*. – 2013. – V.3(65) – P.37-42.

152. L. Radchenko. Comparative analysis of mutations in influenza viruses genes – HA and NA, isolated during 2012-2015 years / L. Radchenko,

О. Smutko, А. Fesenko, А. Mironenko. // Вісник Київського національного університету ім.Т.Шевченка «Біологія». – 2016. – Vol. 1(20). – P.57-61.

153. L.V.Radchenko. Phylogenetic analysis of influenza A viruses (H1N1)pdm circulating during 2014-2015 epidemic season in Ukraine./ L.V.Radchenko O.Yu. Smutko, A.Yu.Fesenko, A.P. Mironenko // Biopolymers and Cell. – 2016. – Vol. 32. N 5. – P. 377-380.