

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

На правах рукопису

Бояльська Оксана Геннадіївна

УДК: 575.86 + 578.832.1

**ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ГРІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-
БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ ГРИПУ
ПІД ЧАС ЕПІДЕМІЙ В ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ**

03.00.06 - вірусологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор
Будзанівська І. Г.

Київ - 2016

ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ, ЩО ВИКЛИКАЮТЬ ГРВІ	12
1.1 Загальна характеристика респіраторних вірусів	12
1.2 Характеристика родини <i>Orthomyxoviridae</i>	14
1.3 Історичні аспекти відомих пандемій ХХ та ХХІ століття	15
1.4 Організація геному вірусу грипу	22
1.5 Реплікація геному вірусу грипу	24
1.6 Білковий склад та антигени вірусу грипу	26
1.7 Механізми еволюції вірусів грипу	34
1.8 Лабораторна діагностика грипу	35
1.9 Філогенетичний аналіз для вивчення вірусів грипу	40
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	43
2.1 Матеріали досліджень	43
2.2 Методи досліджень	43
2.2.1 Виявлення вірусів грипу типів А та В за допомогою панелі праймерів та зондів (Biosearch) методом ПЛР у реальному часі	43
2.2.2 Виявлення інших збудників ГРВІ за допомогою набору «ОРВІ - скрин» (Амплісенс, Россия)	57
2.2.3 Ізоляція виявлених вірусів грипу на культурі клітин MDCK та MDCK-SIAT	60
2.2.4 Визначення типоспецифічності ізольованих вірусів методом РГГА	63
2.2.5 Побудова філогенетичних дерев за допомогою програми MEGA 6.0	65
2.2.6 Статистична обробка результатів	66

РОЗДІЛ 3 РЕТРОСПЕКТИВНИЙ АНАЛІЗ ЗАХВОРЮВАНОСТІ НА ГРИП ТА ІНШІ ГРІ НАСЕЛЕННЯ ЖИТОМИРСЬКОЇ ОБЛАСТІ ЗА ПЕРІОД З 1999 ДО 2015 РР.	67
3.1 Аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ населення Житомирської області	67
3.2 Порівняльний аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ населення Житомирської області в розрізі районів	71
РОЗДІЛ 4 МОНІТОРИНГ ВІРУСІВ ГРИПУ ТА ІНШИХ ЗБУДНИКІВ ГРВІ, ЯКІ БУЛИ ПОШИРЕНІ В ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ ПРОТЯГОМ 2009-2015 РР.	77
4.1 Виявлення вірусів грипу типів А та В методом ПЛР у реальному часі	77
4.2 Виявлення збудників інших ГРВІ методом ПЛР у реальному часі	83
РОЗДІЛ 5 ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ, ВИДІЛЕНИХ У ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ ЗА ПЕРІОД З 2009 ДО 2015 РР.	88
5.1 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу А(Н1N1)pdm, які циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.	88
5.2 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу А(Н3N2), які циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.	94
5.3 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу В, які циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.	102
УЗАГАЛЬНЕННЯ	110
ВИСНОВКИ	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	127

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

АГ - антиген;

аз - амінокислотні залишки;

ВООЗ - Всесвітня організація охорони здоров'я;

ГРІ - гострі респіраторні інфекції;

ГРВЗ - гостре респіраторне вірусне захворювання;

ЗТ-ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією;

ІФН - інтерферон;

ІФА - імуноферментний аналіз;

ІХА - імунохроматографічний метод;

МФА - метод флуоресцируючих антитіл;

НК - нуклеїнова кислота;

нз - нуклеотидні залишки;

Об/хв - обертів за хвилину;

Од/мл - одиниць на 1 мл;

ПААГ - поліакриламідний гель;

РС- вірус - респіраторно-синцитіальний вірус;

РЛА - реакція латекс-аглютинації;

РГА - реакція гемаглютинації;

РГГА - реакція гальмування гемаглютинації;

РНК - рибонуклеїнова кислота;

мРНК - матрична рибонуклеїнова кислота;

кРНК - повні комплементарні транскрипти;

пре-мРНК - попередник матричної РНК;

РЦР - ранні цитокінові реакції;

РЗК - реакція зв'язування комплексу;

РН - реакція нейтралізації;

НА - гемаглютинін;

НА - нейрамінідаза.

ВСТУП

Актуальність. Грип та інші гострі респіраторні інфекції (ГРІ) займають перше місце за частотою та кількістю випадків захворювань у світі [1]. В Україні щорічно на грип та ГРІ хворіють 10-14 млн осіб, що становить 25-30% усієї та близько 75-90% інфекційної захворюваності в країні [2].

До 95% респіраторних інфекцій мають вірусну природу. Вони зумовлюють високі рівні захворюваності та смертності, особливо в людей похилого віку і в групах високого ризику, немовлят, дітей, а також в осіб з ослабленим імунітетом та людей з хронічними хворобами [3, 4, 5]. Відомо більше ніж 200 вірусів, які здатні викликати ураження респіраторного тракту. До найбільш розповсюджених збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) відносять віруси грипу, парагрипу, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовіруси, риновіруси, метапневмовіруси, коронавіруси, ентеровіруси та бокавіруси [1]. Сезонні підйоми захворюваності на грип та інші ГРІ характеризуються змішаною етіологією, у яких частка грипу превалює [2].

Вірус грипу є основним респіраторним вірусом, який може призвести до чисельної кількості випадків госпіталізації та смертей [6]. Віруси грипу викликають щорічні епідемії та разом з іншими ГРІ уражують 5-15% населення у всьому світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) щорічно у всьому світі реєструється 3-5 млн важких випадків грипу і 250000-500000 смертей від нього [7]. Віруси грипу – збудники, які мають здатність викликати пандемії. Пандемії виникають кожні 11-40 років та звичайно протікають хвилеподібно й можуть продовжуватись до 1,5-2 років, іноді – з охопленням за 9-10 місяців до 30% населення земної кулі [2, 8].

Найтяжчою в історії людства була пандемія вірусу грипу А(Н1N1), так званий «Іспанський грип» 1918-1919 рр. [9]. Остання пандемія та перша у ХХІ ст. виникла у 2009 р. та була викликана вірусом грипу А(Н1N1)pdm, який являв собою вірус-реасортант, що утворився з вірусів грипу людини, птахів та

свиней. Набуття цим вірусом властивості передаватися від людини до людини через повітря призвело до швидкого поширення серед людей у країнах різних континентів [10].

Усі пандемії були викликані різними серотипами вірусу грипу типу А. Висока мінливість вірусу грипу зумовлена, по-перше, фрагментарною структурою геному вірусу, а також унікальними антигенними властивостями двох поверхневих глікопротеїнів: гемаглютинину (HA) і нейрамінідази (NA). Віруси грипу типу А більш мінливі, ніж віруси грипу В та С [11]. Змінюючи склад своїх поверхневих антигенів з високою еволюційною швидкістю, віруси грипу мають можливість ухилитися від дії імунної системи, при цьому зберігаючись у популяції людини [12].

Висока мінливість вірусів грипу призводить до необхідності робити порівняння антигенних і біологічних властивостей вірусів грипу під час епідемій [12]. Спостереження і контроль за антигенними властивостями циркулюючих серед населення вірусів грипу щороку необхідні для визначення нового варіанта штаму для включення його до складу вакцини [14, 15].

У даний час в людській популяції циркулюють підтипи вірусу грипу А (H1N1) і (H3N2) та грипу В [16]. Поширеність цих трьох вірусів грипу може змінюватися за часом або географічно усередині країни, між країнами і континентами протягом одного сезону грипу [17].

Отже, моніторинг інтенсивності епідемічного процесу та циркуляції вірусів грипу та інших ГРІ на окремих територіях країни є одним з пріоритетних напрямків епідеміологічного і вірусологічного нагляду та наукових досліджень, що дозволить оперативно оцінювати ситуацію і проводити профілактичні (протиепідемічні) заходи.

Вдалою моделлю для дослідження епідеміологічного профілю ГРІ та філогенетичного аналізу вірусів грипу можна використати Житомирську область, яка на своїй території має добре розвинені транспортні магістралі, як залізничні, так і автомобільні, які з'єднують з центральною, східною та південною частинами України, а також з країнами Східної та Центральної

Європи. Внаслідок цього вірус грипу може швидко потрапляти до Житомирської області з території інших областей та країн.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах технічного завдання держбюджетної теми № 11БФ 036-02 «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (номер держреєстрації 0111U004649). Також пов'язана з роботами, виконаними у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України»: шифр 133, «Розробити програму етіологічного прогнозування епідемій грипу в Україні» 2014-2016 рр. виконання (номер держреєстрації: 0114U000383); шифр 122, «Філогенетичний аналіз вірусів грипу та напрямок їх еволюції» 2011-2013 рр. виконання (номер держреєстрації: 0111U002013).

Мета та завдання дослідження. Дослідити епідеміологічний профіль ГРІ за період з 1999 до 2015 рр. та провести філогенетичний аналіз вірусів грипу, які циркулювали протягом 2009-2015 рр.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі завдання:

1. Провести ретроспективний аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ серед населення Житомирської області за період з 1999 до 2015 рр.
2. Визначити етіологічну структуру популяції вірусів грипу в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.
3. Вивчити поширення вірусів грипу серед різних груп населення в епідемічних сезонах 2009-2015 рр.
4. Провести диференційну діагностику грипу та інших ГРВІ молекулярно-генетичним методом.
5. Виділити та накопичити на чутливій культурі клітин MDCK віруси грипу, що циркулювали протягом 2009-2015 рр. для проведення сиквенування.

6. Провести філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей поверхневих антигенів вірусів грипу для виявлення еволюційних змін.
7. Дослідити нуклеотидні та амінокислотні послідовності генів гемаглютинину та нейрамінідази сиквенованих вірусів грипу і виявити в них мутації.

Об'єкт дослідження: епідемічний процес ГРІ в Житомирській області, генетична мінливість вірусів грипу.

Предмет дослідження: захворюваність на грип та інші ГРІ, молекулярно-генетична характеристика вірусів грипу типів А та В.

Методи дослідження: для виконання поставлених завдань у роботі використано епідеміологічний, вірусологічний, серологічний, молекулярно-генетичний, статистичний методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше показано, що захворюваність на грип населення Житомирської області та України в цілому протягом 17 календарних років має тенденцію до зниження.

Захворюваність на інші ГРІ населення Житомирської області, як і України в цілому, на відміну від захворюваності на грип, реєструється протягом всього календарного року.

Виявлено особливість етіологічної структури популяцій вірусів грипу в Житомирській області протягом 2009-2015 рр., яка відрізняється від України та інших країн Європи та світу. Вірус грипу А(Н1N1)pdm на території Житомирської області виявлявся у чотирьох, вірус грипу А(Н3N2) – в трьох, вірус грипу В – в двох епідемічних сезонах.

Вперше, на прикладі двох епідемічних сезонів протягом 2009-2015 рр. показано моноциркуляцію штамів вірусів грипу (епідемічні сезони 2012-2013 рр. (А(Н1N1)pdm) та 2013-2014 рр. (А(Н3N2)), в порівнянні з Україною та іншими країнами Європи та світу, де в даних епідемічних сезонах спостерігалась ко-циркуляція всіх трьох штамів вірусів грипу.

Завдяки проведенню філогенетичного аналізу методом максимальної правдоподібності показано еволюційні зміни в послідовностях генів гемаглютиніну та нейрамінідази сиквенованих вірусів грипу за період з 2009 до 2015 рр.

Практичне значення одержаних результатів.

На прикладі Житомирської області показано, що проведення епідеміологічного та вірусологічного нагляду за грипом на високому рівні з використанням сучасних лабораторних методів забезпечує необхідною інформацією управлінські структури, що дозволяє вчасно реагувати на появу нових вірусів, в тому числі – з можливими пандемічними потенціалами.

Отримані результати доповнюють інформацію про дослідження властивостей вірусів грипу, циркулюючих в Україні в цілому, що дозволило ідентифікувати й оцінити положення виділених штамів на глобальному рівні. Дана інформація буде повною та більш коректною, якщо такі дані будуть отримані з кожної області України. Це, своєю чергою, потрібно для відбору кандидатів до складу протигрипозної вакцини.

Комплексне застосування тест-систем на грип та інші респіраторні патогени показали доцільність використання диференційної діагностики грипу та інших ГРВІ на підставі проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), зокрема для прийняття рішення лікарями щодо необхідності використання для лікування хворих інгібіторів нейрамінідази.

Результати досліджень використані при внесенні даних України у дві системи нагляду за грипом: Європейську систему TESSY (Flu News Europe) та всесвітню мережу ВООЗ – FluNet, що забезпечило більш повну подачу інформації щодо відображення епідемічної ситуації в нашій країні.

Особистий внесок здобувача.

Дисертація є самостійною роботою автора. Розробка плану експерименту та її реалізація, отримання експериментальних даних, їх узагальнення, інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом академіка НААН,

д.б.н., проф. А. Л. Бойка; д.б.н., проф. І. Г. Будзанівської; д.мед.н. А. П. Міроненко.

Автором вивчено особливості епідеміологічного процесу грипу в Житомирській області за період з 1999 до 2015 рр. разом із заступником начальника Головного управління Держсанепідслужби України в Житомирській області Киричуком І. М.

Лабораторна диференційна діагностика грипу та інших ГРВІ методом ПЛР у реальному часі була проведена у вірусологічній лабораторії ДУ «Житомирський обласний лабораторний центр Держсанепідслужби України» самостійно.

Виділення вірусів грипу на чутливій культурі клітин, проведення штамової ідентифікації виділених житомирських ізолятів проводились у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України».

Філогенетичний аналіз вірусів грипу, що циркулювали в Житомирській області за період з 2009 до 2015 рр., проведений автором особисто на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на засіданнях кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (щопівроку); конференції, присвяченій 50-річчю кафедри вірусології «Вірусологія: минуле, сьогодні, майбутнє» (Київ, 12 квітня 2012); VII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, 10-13 вересня 2013); V Науково-практичній конференції «Біологічні дослідження - 2015» (Житомир, 11-12 березня 2015); Міжнародній конференції для молодих вчених «Сучасні проблеми мікробіології та біотехнології» (Одеса, 1-4 червня 2015); Міжнародній конференції молодих вчених SYS-2015 (Київ, 21-25 вересня 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 наукових праць у фахових наукових виданнях (з них 1 у виданні, що входить до міжнародної бази даних Scopus) та 5 тез наукових конференцій (3 – міжнародні).

Структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 145 сторінках і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, 3 розділів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення отриманих результатів, висновків. Список літератури включає 165 джерел. Дисертація ілюстрована 28 рисунками та 6 таблицями.

РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ, ЩО ВИКЛИКАЮТЬ ГРВІ

1.1 Загальна характеристика респіраторних вірусів

Відомо більше, ніж 200 вірусів, які здатні викликати ураження респіраторного тракту. До найбільш поширених збудників ГРВІ відносять віруси грипу, парагрипу, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовіруси, риновіруси, метапневмовіруси, коронавіруси, ентеровіруси [18] та бокавіруси [19].

Аденовіруси людей (ADV) відносяться до роду *Mastadenovirus* родини *Adenoviridae*. В рід *Mastadenovirus* входить сім груп (A-G), які, своєю чергою складаються із серотипів. Респіраторні захворювання, як правило, пов'язані з групами В (серотипи 3, 7) та С (серотипи 1, 2, 5). Віруси групи D (серотипи 8, 19, 37) часто викликають кератокон'юнктивіт [20].

Аденовіруси є причиною близько 7-8% дитячих вірусних респіраторних інфекцій у всьому світі й викликають широкий спектр клінічних захворювань, зокрема інфекції дихальних шляхів, фарингокон'юнктивальну гарячку, кон'юнктивіт, геморагічний цистит, гастроентерит. ADV пов'язують з важкими і навіть смертельними випадками у людей з ослабленим імунітетом, тому що віруси можуть викликати важке генералізоване захворювання з ураженням багатьох органів [21, 22].

Респіраторно-синцитіальний вірус людини (RSV) належить до родини *Paramyxoviridae* та є основною причиною інфекцій нижніх дихальних шляхів у немовлят і дітей, особливо з вродженими вадами серця й ослабленим імунітетом [23]. Спалахи респіраторно-синцитіальної інфекції є причиною значного збільшення показників госпіталізації протягом зимового сезону [24].

Віруси парагрипу (HPIVs) також відносяться до родини *Paramyxoviridae* та є важливою причиною захворювання верхніх і нижніх дихальних шляхів, особливо серед дітей [6]. Відомо 4 серотипи вірусу парагрипу, які можуть

викликати легкі ГРВІ протягом усього року. Також ці збудники можуть викликати ларинготрахеїт, бронхіоліт і пневмонію, частіше навесні та восени [23]. 1-2 типи НРІVs викликають цілий спектр хвороб, починаючи від звичайної застуди до крупа, бронхіоліту, пневмонії [25].

Бокавірус людини (HBoV) був вперше описаний у 2005 р. та виділений з назофарингеальних аспіратів дітей з респіраторними інфекціями. Вірус належить до роду *Bocavirus* субродина *Parvovirinae* родини *Parvoviridae*. Бокавірусна інфекція останнім часом привертає все більше уваги в усьому світі. Частота та клінічні прояви цієї інфекції коливається в широких межах, і часто включають в себе одночасне інфікування ще іншими збудниками [26].

Метапневмовірус людини (HMPV) належить до родини *Paramyxoviridae*, який був вперше виявлений у дітей з респіраторним захворюванням в Нідерландах. Клінічні симптоми, що викликані HMPV у дітей, є подібні до тих, які спостерігаються при респіраторно-синцитіальних вірусних (RSV) інфекціях, починаючи від легких симптомів пневмонії й закінчуючи більш важкими ускладненнями [27].

Коронавіруси (HCoV) відносяться до родини *Coronaviridae* і циркулюють протягом року з невеликим переважанням в зимовий період, що складає 10-30% випадків з ГРВІ. HCoV поділяються на альфа-коронавіруси (CoV-229E і CoV-NL63) і бета-коронавіруси (CoV-OC43 і CoV-HKU1), які відрізняються на молекулярному рівні [22, 28].

Риновіруси людини (HRVs) відносяться до роду *Enterovirus* родини *Picornaviridae*. Відомо близько 100 серотипів риновірусів. Вони циркулюють протягом року, викликаючи ринорею, нежить, кашель та іноді трахеобронхіт. Лікування риновірусної інфекції обмежене відсутністю факторів та клінічних випробувань [22, 29].

Вірус грипу є основним респіраторним вірусом, який може призвести до великої кількості випадків госпіталізацій та смертей [6]. Віруси грипу викликають щорічні епідемії та разом з іншими ГРВІ щороку уражують 5-15% населення в усьому світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я

(BOO3) щорічно у світі реєструється 3-5 млн важких випадків грипу та 250-500 тис. летальних випадків [5].

1.2 Характеристика родини *Orthomyxoviridae*

До родини *Orthomyxoviridae* входить п'ять родів: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, *Isavirus*. У майбутньому з'явиться шостий рід *Influenzavirus D*, до якого ввійде новий вірус C/swine/Oklahoma/1334/2011 (C/OK) ізольований від свиней і великої рогатої худоби. На сьогодні він умовно включений до роду *Influenzavirus C*, оскільки має низку гомологічних послідовностей з вірусом грипу С людей [30]. Назва родини походить від грецького *муха* – слиз та *orthos* – правильний. Назва родів, до яких належить вірус грипу, походить від лат. *Influentia* – вплив.

З погляду медицини з родини *Orthomyxoviridae* найбільше значення має вірус грипу. Найбільшою кількістю серотипів відрізняється вірус грипу А. Різні штами вірусу грипу типу А уражають птахів, свиней, коней, описані спалахи в тюленів, норок, верблюдів. Водоплаваючі птахи є природним резервуаром вірусів грипу А та їх головною еволюційною нішою. Вірус грипу А спричиняє епідемії та пандемії [31].

Вірус грипу В уражує тільки людей та викликає епідемії кожні 3 роки [32]. Вірус грипу С уражує тільки людей, але клінічно проявляється більш легким перебігом та викликає лише спорадичні спалахи [33, 34, 35].

Початком системного вивчення грипу можна вважати виділення вірусу грипу A/WS/33/ H1N1 в 1933 р. W. Smith, C. H. Andrews та P. P. Leidlow. Ізолят, що відрізняється за антигенними властивостями від вірусу 1933 р., виділений T. Francis у 1940 р., класифікували, як вірус грипу В (штам B/Lee/40). Вірус грипу С вперше був виділений у 1947 р. R. M. Taylor [32, 36].

Морфологічні ознаки вірусів. Віріони вірусів грипу сферичної або плейоморфної форми $d = 80-120$ нм [37]. Зустрічаються також ниткоподібні форми $d = 80-100$ нм та довжиною у сотні нанометрів [38]. Оболонка

складається з клітинних мембранних ліпідів, що з'єднані зі змінною кількістю вірусних гліколіпідів та трьома видами неглікозильованих білків (у вірусу грипу В – 4). Два з них входять до виступаючої частини поверхні віріону – глікопротеїни: гемаглютиніни (НА – від англ. *hemagglutinin*) та нейрамінідаза (NA – від англ. *neuraminidase*) $l = 10-14$ нм та $d = 4-6$ нм. З 550-600 структурних елементів поверхні вірусу, частка NA складає 50-100. Нуклеокапсид містить сегментований геном та має спіральний тип симетрії. Геном складається із сегментів, які мають різний розмір ($l = 50-150$ нм).

За **фізико-хімічними** властивостями представники родини *Orthomyxoviridae* характеризуються як такі, що мають коефіцієнт седиментації 700-800 S (*non-filamentous particles*), плавучу густину вірусних часток у сахарозі – $1,19$ г/см³, у хлориді цезію – $1,34-1,35$ г/см³. Молекулярна вага віріонів – 250×10^6 кДа. Віріони вірусів грипу чутливі до дії високих температур (нагрівання до $50-60$ °C інактивує вірус через 30 хв; 65 °C – через 4 хв), ліпідних розчинників, нейонних детергентів, рентгенівських променів та окисних агентів, висушування, інсоляції. Вони лабільні до дії ефіру, формальдегіду та інших речовин, що денатурують білки [37, 38, 39, 40].

Віруси грипу малостійкі в зовнішньому середовищі – протягом декількох годин руйнуються за кімнатної температури, а за температури $+4$ °C вірус зберігається протягом 2-3 місяці [40]. У замороженому стані за температури -70 °C вони зберігаються роками, не втрачаючи інфекційних властивостей [41]. Вірус стійкий у межах рН 6,5-8,5. Оптимальний рН середовища для збереження вірусу поза клітинами – $7,0-7,5$ [40].

1.3 Історичні аспекти відомих пандемій ХХ та ХХІ століття

За останні 500 років, починаючи з 1510 р., було близько 14 пандемій грипу А. За останні 120 років описано 6 випадків пандемій у 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 і 2009 рр. (рис. 1.1) [42]. Найстрашнішою в історії людства була пандемія в 1918 р., яка викликала близько 675 тисяч смертей в Сполучених

Штатах і до 50 мільйонів осіб у всьому світі. Наслідки пандемій у 1957 і 1968 рр. були такі: близько 70 000 випадків захворювання і 34000 випадків смертності в США. У той час наслідки пандемії 2009 р. – це близько 12000 смертей в Сполучених Штатах Америки [36].

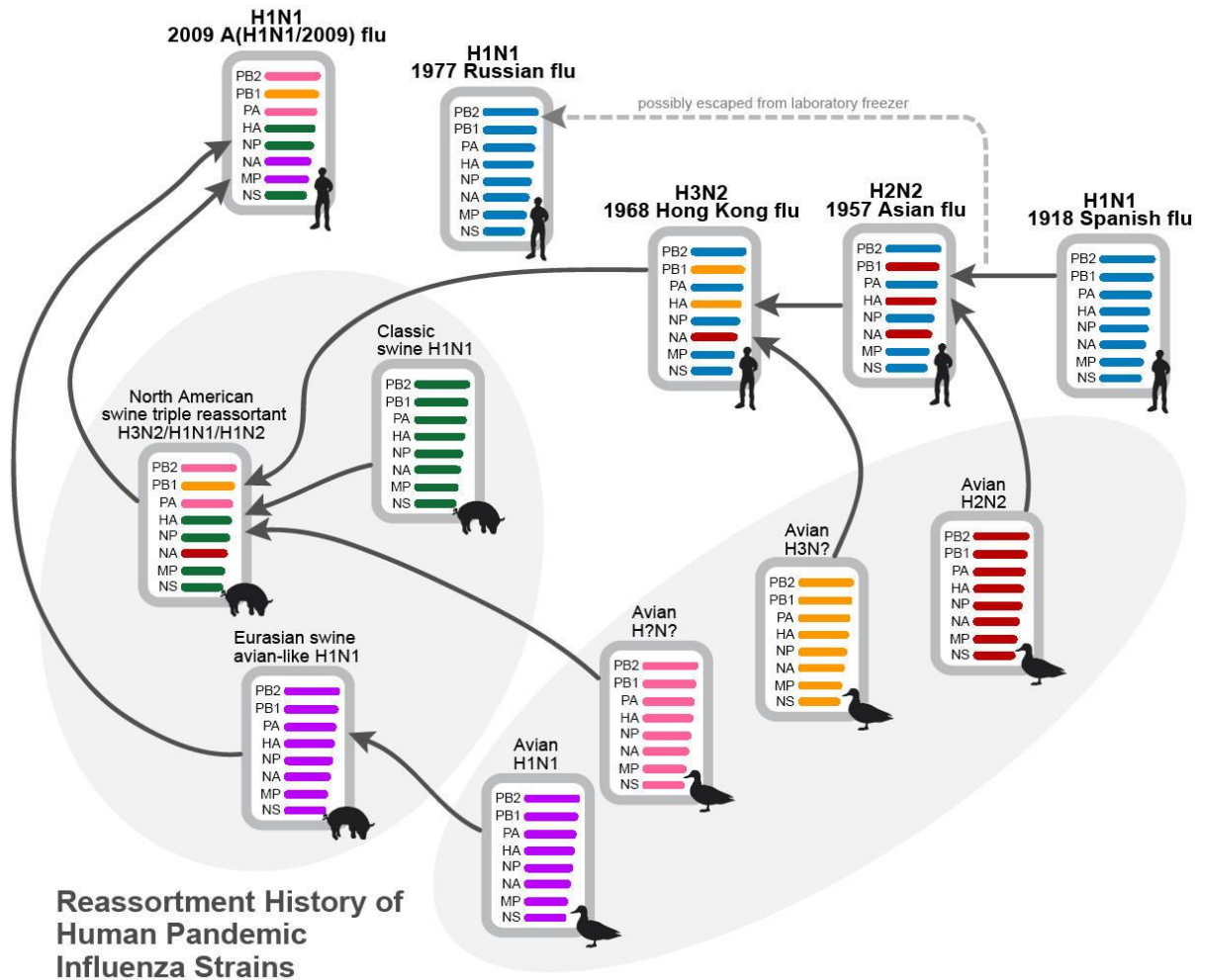


Рис. 1.1 Утворення пандемічних вірусів (Tang J.W., Shetty N., Lam T.T., Non K.L., 2010)

Іспанський грип (1918-1919). Пандемія 1918-1919 рр. забрала близько 50 мільйонів людей в усьому світі [44]. Наслідки таких великих показників смертності складно зрозуміти. Смертність була близько 2,5% (у порівнянні з 0,1% < у інших пандеміях) [36]. Більшість інфікованих у 1918 р. (97%) мали клінічні симптоми типового грипу. Інші епідеміологічні особливості пандемії 1918-1919 рр. були також унікальні, включаючи його трихвильовий перебіг

протягом першого року з «W-подібною» кривою смертності з досі незрозумілим піком серед людей молодого віку.

Пандемія грипу 1918 р. мала ще одну унікальну особливість, водночас розповсюджувались інфекції серед людей та свиней. Вірус грипу пандемії 1918 р. був антигенно новим підтипом, до якого більшість людей і свиней в 1918 р. була імунологічно інтанктна [45].

Нещодавно були опубліковані дані філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей геному вірусу грипу 1918 р., які показали, що гени поверхневих білків вірусу гемаглютиніну (HA) і нейрамінідази (NA) отримані від вірусу, подібного до пташиного [46].

Останні аналізи інших сегментів генів вірусу також є підтвердженням цього висновку. В цілому його походження залишається таємницею [45].

Хоча клінічний перебіг захворювання зазвичай самообмежений, має місце значно вищий відсоток випадків важких легеневих ускладнень. Більше того, смертність під час пандемії 1918 р. була зосереджена у групі надзвичайно молодого віку [47].

Низький показник смертності в людей старше 65 років пояснюється захисним імунітетом, який був набутий на початку 1850 р., а відповідна циркуляція пандемічних вірусів вірогідно розпочалася в 1830 р. та/або у 1840 р. А в 1920 р. вірус зменшив свою «агресивність», проявляючись лише у сезонних ендемічних спалахах та залишився «дрейфувати» протягом майже 40 років. Коли виникла наступна пандемія в 1957 р., вірус A(H1N1) зник із циркуляції, але повернувся в 1977 р. та викликав пандемію з низьким рівнем. Тоді були уражені особи віком молодше 20 років. Вірус продовжує спільно циркулювати в усьому світі й сьогодні, поряд з вірусом грипу A(H3N2), який почав поширюватись в людській популяції з пандемії 1968 р. [38].

Дані сиквенсу вірусу дали змогу припустити, що вірус 1918 р. був новий для людей або з'явився незадовго до 1918 р. Отже, малоімовірно, що його поява відбулася раніше за циркулюючих серед людей штамів грипу, які набули

один або більше нових сегментів внаслідок реасортації, як це було в 1957 і 1968 рр.

Навпаки, інші джерела даних свідчать, що вірус 1918 р. був подібний до вірусу пташиного грипу, який має невідоме походження. Яким чином відбулась адаптація вірусу до популяції людей: чи шляхом адаптації вірусу від птахів до людей, чи адаптація вірусу з проміжним хазяїном – ссавцями або іншими тваринами хазяїна, або поступова адаптація під час препандемічної циркуляції серед людей – невідомо.

Пандемія 1918 р. мала найбільшу кількість летальних випадків серед населення. Захворюваність серед населення в різних районах була від 25-40%, але в більшості випадків – від 97-99%. Захворюваність за віковими групами була схожа на пандемії до та після цієї. У дітей віком молодше 15 років спостерігалися високі рівні захворюваності. Клінічно, пандемія 1918 р. була представлена симптомами, які характерні для перебігу грипу серед осіб 65 років, що призвело до 36-48% випадків смертей від грипу. Вікова група найбільш постраждалих від пандемії 1918 р. коливалась між 20 і 40 роками. На цю вікову групу припала майже половина летальних випадків від грипу під час пандемії.

Незважаючи на прогрес у проведенні секвенсу, реконструкції та накопичення вірусу грипу 1918 р. в експериментальних тваринах, з міркувань безпеки деякі питання щодо вірусу грипу, залишаються мало освітленими [38].

Азіатський грип (1957-1958). Пандемічний вірус грипу, який виник в 1957 р., був прямим нащадком пандемічного вірусу А(H1N1) 1918 р., який набув три нових сегменти геному. Сегменти генів, що кодують поверхневі білки HA і NA, були замінені на H2 і N2 підтипів пташиного вірусу грипу, відповідно. Сегмент гену, що кодує білок PB1 полімеразного комплексу, також замінений подібним до пташиного вірусу грипу сегментом гену. Навіть якщо ця пандемія грипу сталася в епоху вірусології, невідомо, у якому хазяїні відбулась реасортація. Крім того, невідомо, коли у ньому відбулась реасортація і як довго він циркулює та ефективно передається [38].

Пандемія 1957-1958 рр. розпочалась з Південно-Східної Азії та мала глобальне поширення, але характеристика її була не настільки вражаюча, як у попередніх пандеміях 1889 і 1918 рр. Поява вірусу грипу А(Н2N2) в Азії вперше була виявлена у квітні 1957 р., коли стало відомо, що штам вірусу грипу, який викликав спочатку епідемічні спалахи по всій Південній Азії, антигенно відрізняється від штаму А(Н1N1) [38].

Дослідники визначили географічне поширення та характеристику вірусу грипу А(Н2N2). Як перша пандемія грипу, що відбулась в епоху сучасної вірусології, вона була вивчена за допомогою нових вірусологічних і бактеріологічних методів. Клінічні прояви під час цієї пандемії були подібними або ідентичними з тими, які були викликані вірусом 1918 р., хоча деякі епідеміологічні особливості пандемії 1918 р. були відмічені в 1957 р. Як це було при пандемії 1918 р., після двох років вірус набув сезонного, ендемічного і спорадичного характеру, зникаючи повністю на 11 років. На цей час він не повернувся [38].

Гонконгський грип (1968-1969). Пандемію 1968-1969 рр. викликав вірус грипу А(Н3N2) («Гонконгський грип»), який виник внаслідок рекомбінації генів пташиного вірусу грипу, в цьому випадку генів НА і РВ1. Як результат, виникло ще одне нове покоління вірусних нащадків пандемії 1918 р. Вірус грипу швидко поширився з Південно-Східної Азії по всьому світі. Пандемія відзначилася низькою летальністю, яка в деяких районах була менша за непандемічні роки.

Пандемічний вірус грипу А(Н3N2) замінив попередній вірус грипу А(Н2N2). Молекулярний аналіз вірусу грипу А(Н3N2) показав, що Н2 НА був замінений в процесі реасортації з пташиного на Н3 НА і сегмент гену РВ1 полімерази був також замінений, знову шляхом рекомбінації від РВ1 подібного до пташиного вірусу грипу. Решта шість генних сегментів, серед них сегмент гену НА, були збережені від вірусу грипу А(Н2N2) 1957 р. Було висловлено припущення, що відносна м'якість пандемії 1968 р. в порівнянні з попередньою пандемією була результатом збереження НА раніше циркулюючих вірусів, до

якої у більшості населення, принаймні частково, існують захисні антитіла. Було показано, що антитіла до NA обмежили реплікацію вірусу й тривалість та тяжкість захворювання, в той час, як не існувало специфічної профілактики інфекції [38].

Російський грип 1977 р. Перше повідомлення про вірус A(H1N1) з'явилося в Китаї навесні 1977 р., коли він почав викликати захворювання серед молодого населення віком до 23 років. Високий рівень подібності між цим вірусом і тим, що циркулював на початку 1950-х рр. до спалаху A(H2N2) викликає підозру, що в 1977 р. відбувся випадковий викид вірусу грипу A(H1N1) з лабораторії. Це припущення узгоджується також з тим, що він був патогенним для молодого населення; літні люди вже отримали значний імунітет до цих вірусів. Після 1977 р. вірус грипу A(H1N1) знову з'явився та почав циркулювати разом з вірусами A(H3N2), які були на той час. Слід зазначити, що відбулася рекомбінація між двома ко-циркулюючими штамми, внаслідок чого вперше в епідемічному сезоні 2001-2002 рр. був виділений вірус грипу A(H1N2). Ці віруси A(H1N2) не змогли викликати значного рівня захворюваності й не закріпились у наступних епідемічних сезонах [48].

Пандемія 2009 року. Вірус грипу A(H1N1) 2009 р. утворився шляхом рекомбінації між двома раніше існуючими вірусами грипу свиней: Північно-американським «потрійний реасортантом» A(H1N2) та Євразійським A(H1N1) вірусом грипу свиней (рис. 1.2).

Як і пандемічні віруси грипу 1957 і 1968 рр., пандемічний вірус 2009 р. також є нащадком пандемічного вірусу 1918 р., завдяки вірусу грипу свиней «класичної» лінії A(H1N1), що поширений ензоотично серед свиней в Північній Америці з 1918 р. Пандемічні віруси 1957, 1968, 1977 і 2009 рр. мають генетичне походження від вірусу пандемії 1918 р. Можна припустити, що від пандемії 1918 р. ми живемо в специфічній пандемічній ері.

Вірус грипу A(H1N1)pdm був вперше виявлений в Мексиці в березні–квітні 2009 р., але можливо він вже циркулював наприкінці 2008 р. В більшості

випадків як в Сполучених Штатах, так і в інших країнах, були описані важкі пневмонії, особливо на початку мексиканського спалаху.

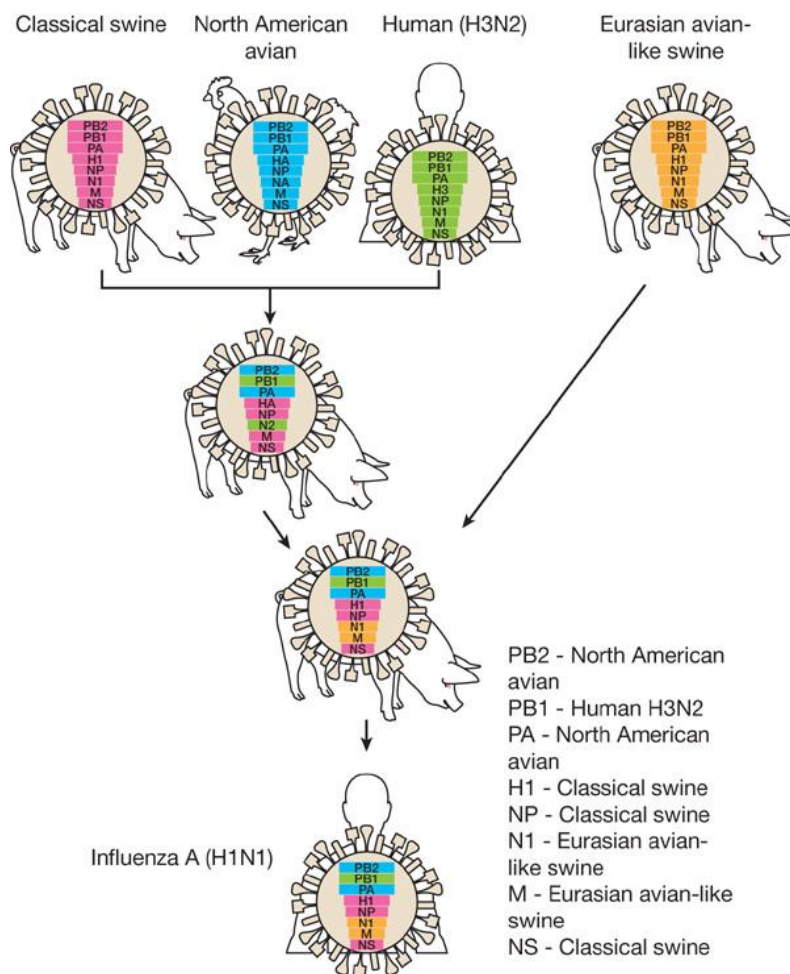


Рис. 1.2 Утворення реасортанту A(H1N1)pdm (Neumann G., Noda T., Kawaoka Y., 2009)

У процесі пандемії почали з'являтися штами, які викликали захворювання, клінічно схожі на сезонний грип, в той час як ВООЗ повідомляла про мільйони випадків захворювання й принаймні 16813 зареєстрованих летальних випадків (станом на 19 березня 2010) [38].

1.4 Організація геному вірусу грипу

Геном утворений одноланцюговою негативною РНК, яка складається з 8 (у вірусу грипу типу С – 7) окремих сегментів у комплексі з білком нуклеокапсиду. Нуклеокапсид має спіральний тип симетрії [50]. Розмір геному сягає 10,0-14,6 нз (нуклеотидних залишків). Зустрічаються дефектні частки [37].

Геном кодує 11 або 12 білків 14-96 кДа [46, 51]. Кожен сегмент геному вірусів грипу представлений одноланцюговою негативною РНК, комплементарною відносно до мРНК для вірусних білків. Довжина ланцюгів сегментів від 874 до 2396 нз РНК-сегменти консервативні та частково комплементарні 3'- та 5'-последностям [46]. Усі сегменти мають майже однакові невеликі ділянки на 3'-кінці та частково комплементарні їм однакові ділянки на 5'-кінці (13 нз у вірусу грипу А). Ці ділянки повністю консервативні у різних варіантах вірусу в межах роду. Дуже великі сегменти геномної РНК кодують полімеразні білки РВ1 та РВ2. Розміри цих двох сегментів у вірусу грипу А однакові (2341 нз).

Перший сегмент кодує білок РВ2, який у вірусу грипу А складається з 759 амінокислотних залишків (аз) і має лише одну рамку зчитування.

Другий сегмент кодує полімеразний білок РВ1, крім рамки зчитування РВ1 розміром 757 триплетів, має додаткову рамку зчитування, починаючи зі 120-го нуклеотиду, довжиною 87 триплетів. Вона кодує РВ1-Ф2, який має спорідненість з мітохондріями та відіграє роль у загибелі клітини внаслідок інфекції (апоптозі).

Третій сегмент (2233 нз) кодує РА (716 аз) та також має одну рамку зчитування. Гетеротример, що має в одній молекулі РВ1, РВ2 та РА, здійснює транскрипцію та реплікацію вірусного геному [52].

Четвертий сегмент кодує гемаглютинін. Розмір четвертого сегмента в різних штаммах вірусів грипу А сильно варіює (1742-1778 нз). Молекула НА синтезується як єдиний поліпептидний ланцюг, який в подальшому проходить процесинг.

П'ятий сегмент має довжину 1565 нз (у вірусу грипу А) та кодує білок NP (498 аз).

Шостий сегмент кодує білок NA. Довжина сегмента, як і довжина білка NA, варіює залежно від штаму вірусу грипу А. У вірусу грипу В шостий сегмент має додаткову рамку зчитування довжиною 100 нз, що кодує трансмембранний глікопротеїд NB, який має функцію транспорту іонів.

Сьомий сегмент вірусу грипу А має 1027 нз. Він кодує білки M1 та M2. Білок M1 кодується повнорозмірною колінеарною мРНК, комплементарною кодуючій частині сьомого сегмента. У вірусу грипу В – білок BM2, схожий за функціями та загальним характером структури з білком M2 вірусу грипу А. Ініціюючий кодон для BM2 перекривається з термінуючим кодоном для M1. Деякі рибосоми починають трансляцію BM2 зразу після термінації трансляції M1. У вірусу грипу С відбувається сплайсинг транскрипту сьомого сегмента, але, на відміну від вірусу грипу А, білок M1 синтезується при трансляції сплайсованої мРНК. Трансляція повнорозмірного транскрипту дає аналог білка M2, який у вірусу грипу С називається CM2.

Восьмий сегмент – найкоротший (890 нз у вірусу грипу А) кодує білки NS1 та NS2 [32, 53].

Сегментований характер геному дає можливість вірусам грипу при змішаному зараженні різними вірусами того самого роду легко утворювати гібридні віруси-реасортанти. Саме внаслідок реасортації вірусу грипу людини та вірусу грипу птахів виникли серотипи вірусу грипу типу А, що викликали пандемії у 1957 та 1968 рр. Реасортант вірусів грипу людини, птахів та свиней А(Н1N1) пандемічний був винуватцем пандемії в 2009-2010 рр. [44, 47, 51]. Вірус грипу А(Н5N1) виник внаслідок реасортації вірусів грипу птахів. Вірус грипу птахів А (Н5N1), здатний передаватися від птахів людині та викликати тяжке захворювання з високою смертністю, але не передається від людини до людини [32, 51].

1.5 Реплікація геному вірусу грипу

Життєвий цикл вірусу грипу можна розділити на окремі етапи: зв'язування з клітинними рецепторами та проникнення в клітину хазяїна; «роздягання» віріону та транспортування вірусної РНК до ядра; реплікація та транскрипція вірусного геному; експорт вірусних РНК з ядра в цитоплазму; збірка та брунькування вірусних віріонів (рис.1.3) [54, 55, 56].

Вірус проникає в клітину шляхом ендоситозу після зв'язування гемаглютиніну з клітинними рецепторами. Ендосома з вірусом зливається з лізосомами, утворюючи вторинну ендосому. Кисле внутрішнє середовище вторинних ендосом змінює конформацію гемаглютиніну, оголюючи пептиди, що викликають злиття вірусної та ендосомальної мембран. Нуклеокапсид звільняється від суперкапсиду та разом із білком М2 виходить у цитоплазму.

Звільнена від нуклеокапсиду РНК вірусу швидко транспортується в ядро, де вже через декілька хвилин після зараження з'являються перші РНК-транскрипти. Кількість різновидів мРНК відповідає кількості сегментів геномної РНК, хоча спектр синтезуючих білків дещо більший. До структурних білків віріону додаються три неструктурних білка (NS1, NS2/NEP, PB1-F2), які беруть участь у реплікації вірусу.

Розширення генетичної ємності РНК досягається завдяки витонченому механізму – повторної трансляції тієї самої мРНК зі зсувом рамки зчитування генетичного коду. Ортоміксовіруси – чи не єдині з РНК-вірусів, що реплікуються у ядрі зараженої клітини. Клітини не здатні транскрибувати РНК, тому операції такого роду зобов'язаний проводити сам вірус. Поштовх дає полімеразний комплекс віріону. Далі починають знову працювати синтезовані ферменти. Білки PB1 і PB2 забезпечують копіювання геномних фрагментів з утворенням неповних та повних за довжиною транскриптів. Вкорочені копії виконують функції мРНК. Віруси грипу не здатні кодувати апарат для отримання послідовності з метильованих нуклеотидів на 5'-кінці (cap) та поліаденілювання 3-кінця (polyA) у мРНК [57].

Таким чином, для рішення цієї задачі, вірус знаходить обхідний шлях. Він підключає свою ендонуклеазу (можливо, білок PA), який відщеплює відповідні блокуючі фрагменти від мРНК клітини-хазяїна та переносить їх на вірусні РНК-транскрипти.

Настільки незвичний прояв молекулярного паразитизму пояснює природу реплікації вірусів грипу в ядрі: тільки тут вони можуть знайти свіжі (ще не зв'язані з білком) мРНК, чутливі до вірусної ендонуклеази.

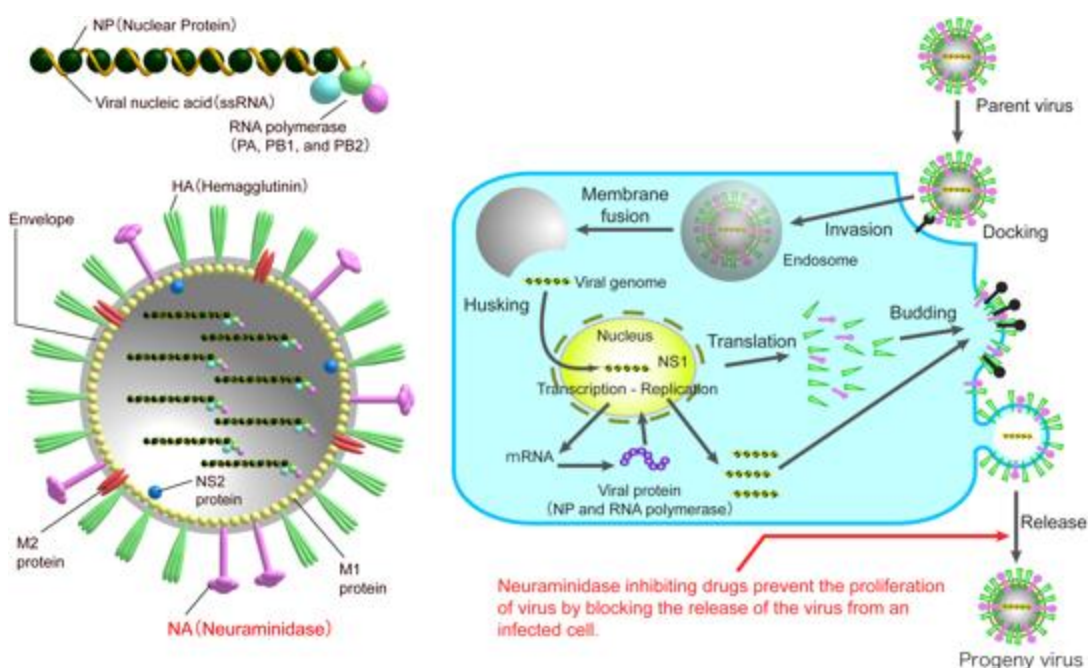


Рис. 1.3 Реплікація вірусу грипу (<http://protein.gsc.riken.jp/Research/Na/fig1.html>)

Повні за довжиною РНК-транскрипти не модифікуються, тому не можуть працювати як мРНК. Вони залишаються у ядрі та служать матрицею для утворення реплікативних РНК, що йдуть на будову нових нуклеокапсидів.

мРНК переправляються у цитоплазму, де транслюються на рибосомах у вірусні білки. Частина синтезованих білків знову переходить у ядро та після комплектації з синтезованими РНК утворює нуклеокапсида. Синтезовані РНК містять багато не виправлених помилок, які призводять до того, що майже кожен новостворений вірус містить мутації [58]. Гемаглютинин та нейрамінідаза включаються у плазматичну мембрану, готуючи фрагменти для

майбутнього суперкапсиду. З внутрішнього боку до них приєднуються М-білки, які орієнтують закріплення нуклеокапсидів у зонах брунькування нових віріонів. При відділенні від клітин вірус отримує суперкапсид з його важливими атрибутами – гемаглютиніном та нейрамінідазою [59]. Вихід зрілих віріонів та їх розповсюдження на сусідні клітини підсилюється за допомогою нейрамінідази. Розмноження вірусу в клітині триває близько 6-8 годин та характеризується збільшенням кількості віріонів у геометричній прогресії, коли з однієї вірусної частинки утворюється до 10 000 нових [52, 60, 61].

1.6 Білковий склад та антигени вірусів грипу

Гемаглютинін (НА) і нейрамінідаза (НА) – поверхневі білки вірусу грипу, які виконують дуже важливі для його існування функції та входять до складу суперкапсиду. Своїми гідрофобними кінцями занурені в біліпідний шар суперкапсиду та на поверхні віріону мають вигляд шипів. В середині НА та НА контактують через М-білки із серцевиною віріону. Їм властива висока мінливість, яка визначає рівень епідемічного процесу, особливо у вірусу грипу А [35]. У віріоні вони знаходяться у співвідношенні 4:1 [62].

Гемаглютинін взаємодіє з клітинними рецепторами, які мають залишки сіалової кислоти, бере участь у проникненні вірусу грипу в клітину, шляхом рецепторного ендоцитозу та виходу вільного від суперкапсиду нуклеокапсиду в цитоплазму клітини [35]. У вірусу грипу А існує 18 антигенно різних підтипів гемаглютиніну [63, 63].

У вірусній частці НА присутній у вигляді тримеру, що складається з трьох ідентичних молекул НА. У кожному мономері є глобула, утворена згорнутим ланцюгом НА1, та стебло, утворене усією НА2 і кінцевими ділянками НА1. На глобулі розташовані рецептор-зв'язуючі сайти. Довгі α -спіралі в складі стебла кожного з мономерів, закручуючись між собою, беруть участь в утворенні тримеру гемаглютиніну [32, 63]. Розмір гемаглютиніну варіює від 562 до 566 аз. Молекула НА синтезується, як єдиний поліпептидний

ланцюг, який надалі підлягає процесінгу: глікозилюванню, сульфатуванню, ацилюванню (приєднання залишку жирної кислоти), відщепленню сигнального пептиду та протеолітичному розщепленню на 2 субодиниці – велику (HA1, 319-326 аз) та маленьку (HA2, 221-222 аз). Субодиниці у зрілій молекулі HA зв'язані дисульфідним зв'язком. Розщеплення необхідне для набування HA функції злиття вірусної оболонки з клітинною мембраною. Вірусній частці з нерозщепленим HA не властива інфекційність. Ділянка розщеплення представлена або одним залишком аргініну, або ланцюгом основних амінокислотних залишків (аргініну та лізину) [63-69].

Молекула HA складається з трьох гідрофобних ділянок. Одна з них – N-кінцевий сигнальний пептид, що відщеплюється у ході процесінгу. Друга – трансмембранна якірна ділянка на C-кінці HA2 закріплює HA у ліпідному шарі. Третя – пептид фузії (злиття) на N-кінці HA2, який виникає після розщеплення гемаглютиніну на дві субодиниці, забезпечуючи злиття вірусної оболонки з клітинною мембраною [32]. HA1 завдяки антигенному дрейфу дуже варіабельна, а HA2 більш консервативна [70]. Субодиниця HA1 має рецептор-зв'язувальний сайт. Вона відповідає за прикріплення вірусу до клітинних рецепторів, що мають залишки сіалової кислоти. Сайт зв'язування сіалової кислоти H1 кожного мономеру HA тримеру перебуває в позиції 111 до 265 аз на дистальному кінці та складається з трьох вторинних структур: одна спіраль (190-спіраль (190-198 аз)) і дві петлі (130-петля (135-138 аз) і 220-петля (221-228 аз)), які знаходяться на краях кожного кінцевого мономеру [71].

У домені HA1 протеїну HA існує 5 варіабельних сайтів (антитіло-розпізнавальні сайти): Sa (аз в положенні 128-129, 156-160, 162-167) та Sb (аз в положенні 187-198), які розташовані поруч з вершиною шипа; Ca1 (аз в положенні 169-173, 206-208, 238-240) та Ca2 (аз в положенні 140-145, 224-225), які є між сусідніми мономерами HA (поверхні субодиниць); Cb (74-79), що знаходиться в межах рудиментарного домену естерази біля основи глобули. Позначення сайтів розшифровуються так: S – штамоспецифічні антигенні сайти, а C – загальні для всіх [72].

Сіалова кислота належить до цукрів, зв'язаних із різними вуглеводами (переважно галактозою) або α -2,3 (SA α -2,3Gal) або α -2,6 (SA α -2,6Gal) глікозидним зв'язком. Вид зв'язку має велике значення, оскільки різні підтипи НА мають різні особливості у зв'язуванні з одним із цих залишків сіалової кислоти. НА людських вірусів грипу переважно прикріплюється до α -2,6 (Neu5Ac- α 2,6-Gal- β 1, 4-GlcNAc), а НА вірусів грипу птахів – до α -2,3 (Neu5Ac- α 2,3-Gal) залишків сіалових кислот. Віруси птахів тропні до SA α -2,3Gal, тому що ці залишки знаходяться на епітеліальних клітинах у шлунково-кишковому тракті птахів. На противагу цьому, верхні дихальні шляхи людини багаті клітинами з рецепторами α -2,6 і, отже, не можуть бути уражені вірусами пташиного грипу. Залишки, що впливають на рецепторну специфічність НА для успішної адаптації різних підтипів НА, вимагають заміни певних амінокислот у рецептор-зв'язуючому домені, пов'язаних з переходом від рецепторної специфічності зв'язування (з SA α -2,3Gal до SA α -2,6Gal або навпаки) [71]. Така рецепторна специфічність обумовлена наявністю визначених амінокислот у позиціях G226L і G228S для H2 і H3 та експериментально H5, E190D і G225D для H1 гемаглютиніну. Наявність у ділянці протеолізу НА лужної амінокислоти визначає низьку патогенність пташиних вірусів грипу та можливість розщеплення в кишечнику та/або у верхньому респіраторному тракті, тоді як декілька лужних амінокислот визначають високу патогенність вірусів та можливість системної реплікації вірусів.

Отже, будова ділянки розщеплення відповідає за тканинний тропізм вірусів [31, 40, 73]. Ці заміни не тільки додають α -2,6 зв'язування та запускають інфекцію серед людей. Вдале розповсюдження вірусів грипу визначають останні чотири людські пандемії (1918 р. – A(H1N1), 1957 р. – A(H2N2), 1968 р. – A(H3N2), 2009 р. – A(H1N1)) [71, 72]. Незважаючи на встановлення важливості конкретних залишків для підвищення SA α -2,6Gal або SA α -2,3Gal тропізму, зміни у зв'язуванні рецептора не завжди коректні. Наприклад, у HA1 ізоляту A/California/07/2009 (H1N1) з недавньої пандемії свинячого грипу (2009), аспарагінова кислота в положеннях 190 та 225 повинні переважно

зв'язуватись з рецепторами, що мають SA α -2,6Gal. На відміну від цього, вірус проявляв виражене подвійне зв'язування з обома рецепторами (SA α -2,6Gal та SA α -2,3Gal). Ця властивість і була відмінністю від сезонних вірусів HA1 і може бути пов'язана з пандемічним характером A/California/07/2009. HA3 від A/X-31, який бере початок від пандемічного вірусу A/Aichi/2/68(H3N2), що також показував подвійне зв'язування із залишками сіалових кислот епітеліальних клітин. Крім того, у двох незалежних дослідженнях тропізму H5N1 до епітеліальних клітин дихальних шляхів ссавців було виявлено, що віруси реплікуються також і в епітеліальних клітинах нижніх і верхніх дихальних шляхів тхорів в природних умовах і в епітелії верхніх дихальних шляхах людей, незважаючи на відсутність SA α -2,6Gal зв'язування.

Отже, важко робити прогнози про зв'язування клітинних рецепторів з HA вірусу грипу та розповсюдженням інфекції, оснований тільки на заміщеннях амінокислот в рецептор-зв'язувальному сайті та виду залишків силових кислот. Тому, тип рецептор-зв'язувальної специфічності має можливість змінитись від «пташиного» до «людини» і може стати передумовою для створення пандемії серед людей [71, 74, 76].

Представники роду *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* мають другий компонент оболонки вірусу – глікопротеїн нейрамінідазу (NA) [46].

Нейрамінідаза (NA) є вірусним глікозидом гідролази, яка каталізує гідроліз кінцевих залишків сіалової кислоти з новостворених віріонів і рецепторів клітини-хазяїна, сприяє виходу новостворених вірусних частинок [74, 76]. Характер зв'язку між сіаловою кислотою та галактозою визначає видову та тканинну специфічність клітинних рецепторів та обмежує коло хазяїв різних варіантів вірусу грипу А [32, 77].

Нейрамінідаза складається з 470 аз. Третинна структура NA вірусу грипу має декілька структурно-функціональних доменів: цитоплазматичний, трансмембранний, «головку» і «стебло». Просторові структури NA вірусів грипу А та В майже схожі, але гомологічні вони між собою лише на 30%. Активний центр та Са-зв'язувальний домен розташовані в «головці».

Са-зв'язувальний домен стабілізує структуру NA за низьких значень рН. Штами підтипу гомологічні між собою на 90%, між підтипами – 50%, а між вірусами грипу А та В – 30% [78].

Білок NA глікозильований і, як HA, підлягає протеолітичному розщепленню. У зрілому вигляді білок NA представлений грибоподібним тетраметром, що має 2 пари молекул NA. Одна вірусна частка несе в собі в середньому 50 тетрамерів [78]. Молекули кожної пари з'єднані дисульфідним зв'язком. У частині мономера, що утворює стебло, у багатьох варіантах вірусу грипу А є делеція. У дистальній частині тетраметра розташований активний центр NA. Білок NA є глікопротеїдом 2-го типу. У ньому немає пептиду, що відщеплюється, а N - кінцева гідрофобна ділянка, яка працює як сигнальний пептид (закріплює синтезуючий білок у мембрані цитоплазматичного ретикулуму), відіграє роль якірної трансмембранної ділянки. Саме проти HA та NA направлений антивірусний імунітет.

Залежно від роду віруси грипу мають маленький **мембранний інтеграційний білок** (M1 і M2 (*ion channel protein*) та M42 у вірусах грипу А; NB та BM2 у вірусах грипу В, CM2 у вірусу грипу С), що забезпечує формування іонних каналів, яке необхідне для ефективного проникнення вірусного генетичного матеріалу в цитоплазму.

У вірусу грипу А присутні M1 (*viral matrix protein 1*) та M2 (*viral matrix protein 2*) білки. Білок M1 кодується повнорозмірною колінеарною мРНК, комплементарною усій кодуючій частині сьомого сегмента. Матрична РНК для M2 отримується внаслідок сплайсингу, при якому вирізається 689 нз Початкова ділянка сплайсованої мРНК включає рамку зчитування з 9-амінокислотного пептиду, загального для M1 та M2. Починаючи з місця сплайсингу, амінокислотні послідовності не збігаються, оскільки трансляція іде зі зсувом рамки зчитування +1. Білок M1 має декілька гідрофобних ділянок. Внутрішній шар оболонки вірусу, створений білком M1 (до 3000 молекул на віріон вірусу грипу А), підстилає ліпідний шар. Білок M2 утворює тетраметр, у якому трансмембранна частина формує канал для транспорту іонів H⁺ у середину

вірусної частки. Це є необхідною умовою для відділення нуклеокапсиду від білка M1 при проникненні вірусного геному в клітину [32]. Крім M1 і M2, з гену сьомого сегмента транскрибуються дві додаткових мРНК: mRNA3 і -4. mRNA4 завдяки сплайсингу, який використовує неоптимальний сайт сплайсингу донора, розташованого на початку M1/M2 відкритої рамки зчитування, і сплайс-акцептор у ділянці біля 3'-кінця M1/M2 відкритої рамки зчитування. Продуктом mRNA4 є M2-подібний білок – M42. M42 може функціонально замінити M2 *in vitro* і *in vivo*, але це не є необхідним для реплікації вірусу грипу А, поки M2 адекватно експресується [79].

У вірусу грипу В дану функцію виконує BM2, схожий за структурою та функціями з білком M2 вірусу грипу А. Він синтезується не при трансляції сплайсованої мРНК, а за рахунок рибосомного зсуву – шифту. Ініціюючий кодон для BM2 перекривається термінуючим кодоном для M1. У вірусу грипу В є додатковий трансмембранний білок NB, який також бере участь в іонному транспорті.

У вірусу грипу С сплайсинг транскрипту сьомого сегмента існує, але, на відміну від вірусу грипу А, білок M1 синтезується при трансляції сплайсованої мРНК. В результаті трансляції повнорозмірного транскрипту синтезується аналог білку M2, який у вірусу грипу С називається CM2 [32].

Внутрішня структура вірусної частки – нуклеокапсид – у вірусах грипу представлений рибонуклеїновими комплексами (vRNPs), що мають вірусну РНК та 4 білки. Головний з них – білок **NP** (*nucleoprotein*). Вірус грипу має 1000 молекул білка NP на віріон.

Інші 3 білки - **PB1** (*polymerase basic 1*), **PB2** (*polymerase basic 2*), **PA** (*polymerase acidic*) – є компонентами вірусної РНК - залежної - РНК-полімерази [70, 80]. Нещодавно ідентифіковані білки вірусу грипу А PB1-N40 і PA-X синтезовані завдяки механізму рибосомального сканування для генерування нової відкритої рамки зчитування (ORFs) [81, 82].

PB1-N40 був визначений як третій важливий поліпептид, синтезований з PB1 мРНК. Білок PB1-N40, як N-термінальна скорочена форма PB1 (39 аз),

транскрибується з п'ятого AUG кодона, який в рамці PB1 є стартовим кодоном, за допомогою розсіяного рибосомального сканування. Незважаючи на те, що новий білок вірусу грипу А показує більш повільну кінетику реплікації, функції білка залишаються незрозумілими. Нещодавно у вірусу грипу А був виявлений білок PA-X. Білок PA-X є продуктом рибосомального зсуву рамки, який включає в себе N-кінцевий домен PA (191 аз) з коротким C-кінцевим доменом (61 аз). Кодується альтернативною рамкою зчитування PA [83]. Нові PA-подібні білки: PA-N155 і PA-N182 також в межах рамки зчитування починають транслюватись з 11 і 13 AUG кодонів в PA-транскрипті, відкидаючи перші 154 і 181 кодонів з нормальних 716 аз білка PA [84].

Білки полімеразного комплексу впливають на процес синтезу вірусного геному. Вони є детермінантами вірусної патогенності, яка визначається амінокислотами в позиціях 627 (відповідають за можливість вірусу реплікуватись у визначених видах, що визначає діапазон хазяїв) та 701 (відповідає за зв'язок з ядерним транспортним білком – імпортином- α у клітинах ссавців) протеїну PB1-F2. Усі людські віруси грипу, у тому числі В та С, мають у позиції 627 білка PB2 лізин, що визначає можливість вірусу розмножуватися за температури 33 °С верхніх дихальних шляхів. Практично усі пташині віруси містять глютамінову кислоту, яка дає можливість вірусу розмножуватися за температури 41 °С кишечника птахів [85-90]. Цікаво, що пандемічний вірус грипу 2009 р. не має ні PB2 627K, ні 701N мутації, які пов'язані з високою патогенністю, хоча були визначені компенсаційні мутації другого сайту в білку PB2 (590S і 591R) [91].

PB1-F2 невеликий білок (90 аз), який кодується за допомогою +1 рамки зчитування гену PB1 [90]. Білок PB1-F2 стимулює механізми апоптозу, особливо моноцитів, посилення запального процесу та збільшення частоти тяжкості вторинної бактеріальної інфекції [32, 92].

Залежно від роду віруси мають **неструктурні білки (NS1 (nonstructural protein 1), NS2 (nonstructural protein 2) або [NEP] (nuclear export protein))**. У всіх вірусів грипу (А, В, С) білок NS1 утворюється внаслідок трансляції

повнорозмірної мРНК, не підлягає сплайсингу. Білок NS1 потрібен вірусу для протидії антивірусному ефекту інтерферону (ІФН) та інших інтерлейкінів (ІЛ), включаючи фактор некрозу пухлин та інтерлейкін-6. На С-кінці NS1 знаходиться чотири амінокислоти, що формують домен PZD-ліганду (*Post-synaptic density - 95, Discs large, Zonula occludens*), що, можливо, впливає на вірулентність вірусів грипу А, взаємодіючи з протеїнами хазяїна, які також мають ці домени. Послідовність амінокислот, формуючих PZD-ліганд, С-закінчення білка NS1 Arg-Ser-Glu-Val та Arg-Ser-Lys-Val відповідають за низьку патогенність вірусу, а в той час як Glu-Ser-Glu-Val та Glu-Pro-Glu-Val за високу [32]. Ті молекули РНК, які зазнають дії сплайсингу, транлюються з утворенням білка NS2, який експортує новосинтезований нуклеокапсид з клітинного ядра в цитоплазму. При сплайсингу у вірусу грипу А видаляється ділянка мРНК довжиною 473 нз. Білки NS1 та NS2 довгий час вважались неструктурними (NS - від англ. *non-structural*), але зараз відомо, що у вірусної частки є декілька десятків молекул NS2. Тому останнім часом цей білок частіше називають NEP. На відміну від NS1, NS2 білок є структурним компонентом віріону й асоціюється з вірусним матричним білком М1. NS2 є посередником експорту vRNPs з ядра до цитоплазми через експорт сигналу завдяки його взаємодії з XPO1. Крім того, NS2 взаємодіє з нуклеопорінами й відіграє роль адаптера між vRNPs і комплексом ядерної пори. Також було запропоновано роль NS2 у регуляції транскрипції й реплікації вірусу грипу. Але багато функцій NS2, зокрема, його транзит через цитоплазму і його включення у вірусну частку, залишаються незрозумілими [93].

Віруси грипу відносять до складних вірусів, і тому у своєму складі вони, крім білків, мають ще ліпіди та вуглеводи.

Ліпіди у віріоні складають близько 18-37% оболонки вірусу. Вони мають спорідненість з ліпідами клітинної плазматичної мембрани.

Вуглеводи знаходяться у віріоні у вигляді глікопротеїнів та гліколіпідів та складають близько 5% від усієї маси. Склад глікопротеїнів та гліколіпідів у господаря та вірусів різний [46].

1.7 Механізми еволюції вірусів грипу

Капсид вірусу складається з двох основних антигенних білків: гемаглютиніну та нейрамінідази. Виявлено 18 різних підтипів гемаглютиніну (H1-H18) та 11 різних підтипів нейрамінідази (N1-N11) вірусу грипу А [21, 94, 95]. Серед людей встановлено циркуляцію вірусів з гемаглютинінами 1-5 і нейрамінідазами 1-2 [45, 96]. Спостереження за останні 15 років показали, що поруч із циркулюючими вірусами грипу А(H1N1) і А(H3N2) також циркулюють два відмінних за антигенами віруси грипу типу В: В/Yamagata/16/88 та В/Victoria/2/87. Один із цих двох ліній вірусу грипу В, як правило, домінує над іншим під час сезонного грипу [97, 98].

Віруси грипу змінюють склад своїх поверхневих антигенів із високою еволюційною швидкістю, що дає їм можливість ухилитися від дії імунної системи, при цьому зберігаючи себе в популяції людини [99]. Існує два основні еволюційні механізми, які дозволяють їм постійно розвиватися й повторно заражувати своїх хазяїв – це антигенний дрейф та антигенний шифт [100, 101].

Антигенний дрейф відбувається внаслідок поступового накопичення мутацій, які фіксуються у вірусному геномі. Такі мутації можуть зумовити незначні зміни в складі вірусних білків, що призводить до кращого виживання цих вірусів, включаючи потенціал для уникнення розпізнавання імунною системою [101]. Дрейфові варіанти вірусів викликають щорічні підйоми захворюваності [103].

При антигенному шифті, вірус грипу А може отримати сегмент НА, і, можливо, сегмент NA або інший сегмент геному від вірусу грипу іншого підтипу, в результаті чого виникає кардинально новий вірус грипу з новими властивостями [101]. Також відновлення циркуляції зниклого штаму після довгої персистенції в організмі хазяїна (людини, птахів, тварини). Поява шифтових варіантів вірусу грипу типу А призводить до розвитку пандемій [45, 102].

Для вірусу грипу В антигенна мінливість обмежується тільки дрейфом, оскільки він не має природного резервуару серед птахів та тварин.

Для вірусу грипу С характерна велика стабільність антигенної структури та з ним пов'язані лише локальні спалахи та спорадичні випадки захворювання.

Висока мінливість вірусів грипу призводить до необхідності проводити порівняльне дослідження антигенних і біологічних властивостей вірусів грипу під час епідемій [103]. Також спостереження і контроль за антигенними властивостями циркулюючих серед населення вірусів грипу щороку необхідні для визначення нового варіанту штаму для вакцини [15].

1.8 Лабораторна діагностика грипу

На сьогодні основними методами лабораторної діагностики грипу є проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) для визначення специфічної РНК вірусів грипу А та вірусу грипу В з подальшим субтипунням. Виділення вірусів з носоглоткових змивів на культурі клітин MDCK та курячих ембріонах з подальшим визначенням наявності того чи іншого типу вірусу в реакції гемаглютинації (РГА) та ідентифікації в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) є дуже важливими для проведення моніторингових досліджень за циркуляцією вірусів грипу на території. Виявлення вірусних антигенів методами імунофлуоресцентної мікроскопії (МФА) та імуноферментного аналізу (ІФА) наразі втрачають свою актуальність з причини їх низької специфічності та чутливості. Вивчення динаміки специфічних антитіл у парних сироватках, відібраних на початку захворювання у перші 3-5 днів та через 2-3 тижні, проводять методом РГГА і має ретроспективне значення [104-106].

Вважається перспективним впровадження методик, що дозволять прискорити отримання результату. За допомогою ПЛР результати можливо отримати протягом декількох годин [47].

Вірусологічний метод діагностики. Виділення вірусу грипу проводиться для отримання інфекційного вірусу, який може бути використаний для вивчення антигенних властивостей, виробництва вакцин і діагностичних препаратів. Курячі ембріони традиційно вважаються «золотим стандартом» для виділення вірусу грипу та його накопичення. Але існують безперервні клітинні лінії, які використовуються для виділення вірусу грипу. У даний час клітинні культури MDCK та MDCK-SIAT широко використовуються для виділення, розмноження та титрування [107].

Матеріалом для дослідження є мазки та змиви з носоглотки, виділення з носа, які беруть сухими або вологими стерильними ватними тампонами в перші дні захворювання; спинномозкова рідина. У разі летальних випадків забираються шматочки уражених тканин легень, бронхів, трахеї.

Для виділення вірусу проводять зараження 10-11-денних курячих ембріонів (введення матеріалу в амніотичну або алантоїсну порожнину). Заражають, як правило, 3-5 ембріонів. Ембріони інкубують за оптимальної температури 33-34 °C протягом 72 годин. Після інкубації курячі ембріони охолоджують при температурі +4 °C протягом 2-4 годин, відбирають алантоїсну або амніотичну рідину. За допомогою РГА визначають наявність вірусу. За умови наявності в матеріалі вірусу, який має гемаглютинуючі властивості, його титрують за допомогою розгорнутої РГА, визначаючи титр гемаглютинуючої активності – найбільше розведення вірусу, яке дає реакцію гемаглютинації. Ідентифікують віруси грипу за допомогою РГГА – реакції гальмування гемаглютинації.

Виділяти вірус можна, використовуючи лінії культур клітин. Основною є перещеплювальна лінія клітин нирок собаки (MDCK). У клітинній культурі проявляється цитопатична дія вірусів (ЦПД) (поява клітин із фестончастими краями, вакуолями, формування внутрішньоядерних і цитоплазматичних включень), яка призводить до дегенерації моношару клітин. Для ідентифікації виділених вірусів використовують метод РГГА (за умови, якщо титр гемаглютинінів становить у культуральній рідині не менше 1:8). Крім цієї

реакції можна використовувати реакції гальмування гемадсорбції (РГГадс), однак вона є менш чутливою і вимагає титру імунної сироватки не менше 1:160, а також реакція зв'язування комплекменту (РЗК), реакції нейтралізації (РН).

Строки культурального дослідження (до 7 діб) обмежує його застосування у тих випадках, коли необхідно швидко встановити діагноз [108, 109].

Метод гальмування гемаглютинації (РГА) використовується для виявлення ізолятів вірусів грипу оснований на властивості гемаглютиніну (НА) вірусу грипу зв'язуватися з еритроцитами, змушуючи їх склеюватися.

Недоліки методу РГГА включають необхідність усунення неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, що зустрічаються в сироватці крові; необхідність стандартизації тест-антигенів кожного разу, коли тест виконується. Однак, метод РГГА залишається одним із важливих методів для проведення епіднагляду за грипом та для визначення антигенних характеристик ізолятів вірусу грипу [15].

Серологічні дослідження. Серологічні методи мають важливе значення для епідемічних та імунологічних досліджень; для оцінки гуморальної відповіді після вакцинації; а в деяких ситуаціях, коли ідентифікація вірусу іншими методами не можлива (наприклад, коли відсутнє вірусовиділення).

Метод РГГА ґрунтується на визначенні чотирикратного зростання титру антитіл у сироватці хворого [110]. Першу сироватку отримують на початку хвороби в гострому періоді (2-5-й день хвороби), другу – після 10-14-го дня захворювання. Оскільки сироватки досліджують одночасно, першу з них зберігають у морозильній камері за температури -20°C .

Коли в сироватці крові присутні антитіла щодо конкретного НА, вони зв'язуються з антигенними сайтами на протеїні НА і ці сайти блокуються, тому стають недоступними для зв'язування з еритроцитами.

Експрес-діагностика. Метод флуоресцируючих антитіл (МФА). Даний метод базується на виявленні у досліджуваному матеріалі специфічних

вірусних антигенів за допомогою імунофлуоресценції у прямій та непрямій МФА [110]. Для цього використовується змив та мазки з носоглотки, а в разі летальних випадків забираються шматочки уражених тканин верхніх та нижніх дихальних шляхів. Роблять мазки та відбитки, які обробляються імунофлуоресцентними сироватками, кон'югованими з флуорохромами, наприклад, ФІТЦ (флуоресцеїнізотіоціонат). При дослідженні препаратів за допомогою люмінесцентного мікроскопа спостерігають зелено-жовте світіння антигенів вірусів грипу, які локалізуються на початку хвороби у ядрах епітеліальних клітин [112]. Чутливість методу значною мірою залежить від якості зразка, специфічність від реактивів, які використовуються та від рівня досвіду тих, хто виконує інтерпретації результатів. Виявлення вірус-інфікованих клітин у секреті з носоглотки за допомогою прямого або непрямого методів імунофлуоресценції широко використовується. Крім того, вона, як і раніше вимагає принаймні двох годин [110].

Вищевказані методи діагностики грипу потребують наявності як обладнання, так і цілого набору реактивів, тому не можуть здійснюватися в лікувальних установах [110].

Імунохроматографічний метод. Імунохроматографічний аналіз (ІХА) заснований на реакції між антигеном і відповідним йому антитілом в біологічних матеріалах [113]. Швидкий діагностичний тест грипу (*RIDT - rapid influenza diagnostic test*), оснований на явищі латеральної дифузії. На сьогодні це найкращий вибір для скринінгу зразків з метою діагностики вірусу грипу не відходячи від ліжка хворого завдяки його швидкості виявлення, простоти в експлуатації й низької вартості. Проте RIDT не в змозі додатково ідентифікувати підтип вірусу грипу А. Швидкі тести не такі чутливі, як ПЛР у реальному часі. Тим не менш, він може забезпечити швидку діагностику грипу А або В. Матеріалом для дослідження може бути мазок, змив та секрет з носової частини глотки [111].

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В основі ПЛР лежить багатократне копіювання певного фрагмента дезоксирибонуклеїнової кислоти

(далі - ДНК) за допомогою ферменту термостабільної ДНК-полімерази та специфічних праймерів. ПЛР дозволяє виявити специфічну ділянку геному біологічного агента. Метод ПЛР має високу чутливість, специфічність, забезпечує можливість роботи майже з будь-яким видом біологічного матеріалу, пробами з об'єктів довкілля, включаючи харчові продукти, є експрес-методом, який дозволяє виконувати аналіз протягом 4-8 годин. Специфічність ПЛР визначається здатністю праймерів із високою ймовірністю «розпізнавати» певну ділянку нуклеїнової кислоти (НК) і зв'язуватися з нею за принципом компліментарності. Аналітична чутливість тест-систем для виявлення НК мікроорганізмів методом ПЛР становить 1×10^2 - 1×10^4 мікробних клітин (геномеквівалентів/мл), специфічність – 85-100%.

За способом детекції продуктів ампліфікації розрізняють декілька форматів реакції:

- класичний (облік результатів реакції за допомогою електрофорезу);
- ПЛР з детекцією за допомогою гібридизаційно-імуноферментного аналізу (ГІФА);
- ПЛР з флуоресцентною детекцією у «кінцевій точці» (після закінчення реакції);
- ПЛР з флуоресцентною детекцією у режимі «реального часу» (Real-Time PCR).

При використанні ПЛР в класичному форматі детекцію ампліконів здійснюють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Результат детекції фотографують або сканують і архівують в пам'яті комп'ютера. Метод не передбачає кількісного визначення.

ПЛР з детекцією ГІФА виконується за допомогою специфічних тест-систем з внутрішніми ДНК-зондами. Метод дозволяє в низці випадків значно підвищити чутливість і специфічність детекції ПЛР-продуктів.

ПЛР з флуоресцентною детекцією у «кінцевій точці» дозволяє реєструвати результат ампліфікації за допомогою детекторів типу «Джин» або

«Ала $\frac{1}{4}$ » після закінчення реакції («*end-point detection*»), не відкриваючи пробірок. Цей метод також не є кількісним [114, 115].

Для ПЛР у «реальному часі» також використовують флуоресцентномічені олігонуклеотидні зонди. Цей метод дозволяє проводити моніторинг і кількісний аналіз накопичення продуктів реакції, оскільки кінетика накопичення пов'язана із вихідною кількістю матриці НК. Використання математичних методів аналізу результатів дослідження дозволяє автоматизувати їх інтерпретацію, й у такий спосіб зняти проблему суб'єктивної оцінки результатів електрофореграм [115-117].

MRT-PCR (*multiplex reverse transcriptase polymerase chain reactions*) мультиплексна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією – це новий метод, що дозволяє відносно швидко виявити одночасно кілька респіраторних вірусів і дає можливість клініцистам проводити диференційну діагностику респіраторних хвороб за симптомами, тяжкістю захворювання та інше [118, 119].

Теоретично даний метод дає змогу виявити одиничні молекули РНК приблизно з 200 нуклеотидів у клінічному матеріалі [114].

1.9 Філогенетичний аналіз для вивчення вірусів грипу

Молекулярні методи, які включають аналіз нуклеотидних послідовностей, давно і міцно зайняли лідируючі позиції в арсеналі засобів, що використовуються сьогодні в філогенетиці й систематиці [120].

Філогенетика (філогенетична систематика) – область біологічної систематики, яка займається ідентифікацією і поясненням еволюційних взаємовідносин серед різних видів життя на Землі як сучасних, так і вимерлих. Філогенетичний аналіз застосовується для виявлення взаємозв'язку між таксонами (даними, об'єктами), а на підставі його результатів будується кладограма або дерево.

Філогенетичне дерево (еволюційне дерево, дерево життя) – дерево, яке показує еволюційні взаємозв'язки між різними видами, що мають загального предка. Вершини філогенетичного дерева поділяються на три класи: листя, вузли й корінь (максимум один). Листя – це кінцеві вершини, тобто ті, у які входять рівно по одному ребру; кожен лист відображає якийсь вид живих організмів (або інший об'єкт, схильний до еволюції, наприклад, домен білка). Кожен вузол являє еволюційну подію: розділення виду предка на дві або більше, які в подальшому незалежно еволюціонували. Корінь представляє загального предка всіх аналізованих об'єктів. Ребра філогенетичного дерева прийнято називати «гілками». Взаємне розташування гілок називається топологією [121].

Для більшості методів будови філогенетичних дерев як вхідні дані необхідні вирівняні амінокислотні та нуклеотидні послідовності.

Насамперед потрібно зробити вибірку та вирівнювання генів одного типу від організмів, які будуть порівнюватися. Розрізняють парне (вирівнювання двох послідовностей ДНК, РНК або білків) і множинне (вирівнювання трьох та більше послідовностей). Найбільш відомою програмою для множинного вирівнювання послідовностей є Clustal, що являє собою результати в форматі FASTA. Якість вирівнювання дуже впливає на топологію створюваного дерева, тому, не дивлячись на високу якість роботи алгоритмів, для вирівнювання іноді потрібне ручне корегування даних [122].

Після проведення вирівнювання дані обробляються за допомогою різних методів будови філогенетичних дерев. Розмір і характер вибірки може суттєво вплинути на значення коефіцієнтів матриці відстаней. Зазвичай, коректність вирівнювання послідовностей і метод розрахунку еволюційних дистанцій більше впливають на топологію і довжину гілок дендрограми, ніж метод її будови.

Далі на основі отриманої матриці будується філогенетичне дерево, де послідовності, які мають малу відстань, розташовуються ближче один до одного. Недоліком всіх матричних методів є перетворення кожної

послідовності в одне число, що неминуче призводить до зниження кількості інформації. Існує дві основні групи методів філогенетичної реконструкції в залежності від використаної концепції: дистанційно-матричні (наприклад, Neighbour Joining, UPGMA, NeighbourNet) і статистичні (наприклад, метод Байєса, максимальної парсимонії, максимальної правдоподібності). Методи обох груп мають свої переваги та недоліки. Вибір методу здійснюється залежно від даних та обмежень моделі.

Для статистичного підтвердження коректності створених дерев існує багато методів, але більша частина з них оснований на алгоритмі бутстрепа (bootstrap). Для кожного методу будови дерев існує декілька спеціальних різновидів методу бутстрепа (параметричний і непараметричний бутстреп, Jack-knife). Найчастіше використовується метод непараметричного бутстрепа.

Для проведення філогенетичного аналізу існує безліч комп'ютерних програм (UGENE, PALM, RAUP, MEGA 6.0), за допомогою яких можливо дослідити нуклеотидні або амінокислотні послідовності та оптимізувати саму схему аналізу відповідно до об'єкта досліджень [123, 124].

Отже, використання філогенетичного аналізу дає можливість проаналізувати досліджувані послідовності з метою вивчення еволюції вірусів грипу, виявлення мутацій в нуклеотидних послідовностях генів.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали досліджень

Матеріалом для дослідження були зразки клінічного матеріалу – проби носоглоткових змивів, мазків із зіву, носоглотки, носа відібрані у перші 3 доби від хворих з підозрою на грип і ТРВІ (тяжка респіраторна вірусна інфекція) та секційний матеріал (тканина легень) від померлих. Пацієнти знаходились на стаціонарному лікуванні в дитячих та дорослих інфекційних відділеннях лікарень Житомирської області. Секційний матеріал від померлих осіб відбирався у патолого-анатомічних бюро та бюро судово-медичної експертизи.

За епідемічний період 2009-2010 рр. у Житомирській області досліджено 215 проб, з яких 56 (зокрема, 16 проб секційного матеріалу – тканини легень) – у лабораторії вірусології та СНІД Центральної санітарно-епідеміологічної станції МОЗ України (м. Київ) та 159 (серед них 6 проб секційного матеріалу) – у вірусологічній лабораторії Житомирської обласної санітарно-епідеміологічної станції. За епідемічний сезон 2010-2011 рр. у вірусологічній лабораторії Житомирської обласної санітарно-епідеміологічної станції досліджено 346 проб (зокрема, 6 секційних матеріалів). За епідемічний сезон 2011-2012 рр. протестовано 72 проби (серед них 3 секційних матеріали), за епідемічний сезон 2012-2013 рр. – 75 проб (зокрема, 2 секційних матеріали), за епідемічний сезон 2013-2014 рр. – 67 проб, за епідемічний сезон 2014-2015 рр. – 70 проб. Лабораторна діагностика була проведена методом ПЛР у реальному часі.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Виявлення вірусів грипу типів А та В за допомогою панелі праймерів та зондів (Biosearch) методом ПЛР у реальному часі

Дослідження проведені за протоколом для полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією у реальному часі для виявлення і

дослідження грипу A(H1N1)pdm з центру контролю та профілактики захворювань (CDC) США (версія 2009) наданою BOO3 [117].

Для детекції вірусів грипу типів А та В використовували набори для екстракції (Total RNA Mini Kit Spin Format, Bio-Rad) та зворотної транскрипції (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad), набори праймерів та зондів відповідних маркерів – Univ inf A, sw A, sw H1, H1, H3, Univ inf B, РНКаза Р (Biosearch).

Виділені РНК вносили у приготовану реакційну суміш для проведення зворотної транскрипції та ставили в ампліфікатор. За допомогою комп'ютерної програми вибирали потрібний температурний режим та планшет, проводили зворотну транскрипцію, внаслідок якої отримували комплементарну ДНК (кДНК).

Синтезовану кДНК додавали в реакційну суміш згідно маркерів (Universal Influenza A, Asw, H1sw, H1, H3, Universal Influenza B, РНКаза Р) у пробірках типу «епендорф» або планшеті для проведення ампліфікації (ПЛР). За допомогою комп'ютерної програми вибирали також температурний режим та потрібний протокол із внесеними номерами хворих та проводили ампліфікацію.

Результати ампліфікації фіксували за допомогою комп'ютерної програми. Результати реакції вважаються достовірними, якщо відповідають певним вимогам, а саме: у негативному контролі етапу виділення РНК та етапу ПЛР зростання флуоресценції відсутнє; у позитивному контролі ПЛР спостерігалися позитивні сигнали від відповідних маркерів. При цьому ампліфікаційні криві повинні перетинати порогову лінію не пізніше 37-го циклу). Зразок вважався позитивним, якщо в усіх клінічних зразках спостерігався позитивний сигнал за РНКазою Р та характерний S-подібний вигляд як у логарифмічному, так і в лінійному масштабі графіка.

На графіку визначається пороговий цикл (на межі перетину ампліфікаційної кривої та порогової лінії) або номер першого циклу, у якому відбувається стрімкий експоненціальний ріст флуоресцентного сигналу. Його

значення залежить від початкової кількості копій матриці, належної якості зразка та ефективності ампліфікації кДНК.

***Виділення РНК за допомогою набору Aurum Total RNA Mini Kit Spin Format,
Bio-Rad***

Компоненти набору:

1. РНК-зв'язуючі колонки.
2. Відкриті промивочні пробірки, 2 мл.
3. Закриті мікроцентрифужні пробірки, 1,5 мл.
4. Закриті мікроцентрифужні пробірки, 2,0 мл.
5. ДНКаза I (ліофілізована).
6. Лізисний розчин 50 мл (*Lysis Solution*).
7. Низькоточний промивний розчин (5x концентрат) 20 мл (*Low ringency wash Solution*).
8. Високоточний промивний розчин 40 мл (*High stringency wash Solution*).
9. Елююючий розчин 10 мл (*Elution Solution*).
10. Розчин для розведення ДНКази 10 мл.

Усі компоненти набору зберігаються за кімнатної температури. У разі появи осаду розчини прогрівали за температури 37 °С. Перед використанням доводили до кімнатної температури.

Обладнання та матеріали, необхідні на етапі виділення РНК:

1. Ламінарний бокс.
2. Ультрацентрифуга.
3. Дозатор на 1000 мкл.
4. Дозатор на 100 чи 200 мкл.
5. Наконечники на 1000 мкл із фільтром.
6. Наконечники на 100 чи 200 мкл (відповідно до дозатора) з фільтром.
7. Пробірки на 1,5 мл.

Необхідні реагенти, що не включені до набору:

1. β-меркаптоетанол 14,2 М (500 мкл на 1 набір).
2. Етанол 96-100% (80 мл на 1 набір).

3. Етанол 70%.

Підготовка компонентів набору до роботи:

1. У флакон із розчином *Low stringency wash solution* додавали 80 мл 96° етанолу. Обережно перемішували колоподібними рухами, не утворюючи піни. Додавали один раз при першому відкритті набору!
2. До розчину *Lysis Solution* додавали 500 мкл β-меркаптоетанолу 14,2 М (кінцева концентрація β-меркаптоетанолу в розчині – 1%). Додавали один раз при першому відкритті набору!
3. Реагенти *DNase I ma DNase dilution solution* не знадобляться при виділенні вірусної РНК. Тому реагент *DNase dilution solution* рекомендується зберігати окремо, щоб не переплутати його з іншими реагентами.

Набір розрахований на виділення РНК з 50 зразків біологічного матеріалу. Міні-набір для очищення тотальної РНК Aurum Total RNA Mini Kit швидко звільняє зразки РНК від клітин ссавців, бактерій та дріжджових грибків (*Saccharomyces cerevisiae*), рослин. Зразки, підготовлені за допомогою набору Aurum total RNA mini kit придатні для використання в більшості подальших операцій, включаючи ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Усі розчини та зв'язуючі колонки в наборі не мають РНКаз, завдяки чому забезпечується цілісність ізольованої молекули РНК.

Екстракція РНК

I. Ротоглоткові та носоглоткові мазки та змиви:

1. Переносили 1 мл матеріалу в пробірку на 1,5 мл (не з набору) за допомогою дозатора та наконечника з фільтром. Як негативний контроль етапу виділення використовували 1 мл дистильованої води.
2. Центрифугували 2 хв на швидкості 12 тис. об/хв у мікроцентрифузі.
3. Із дна пробірки забирали клітинний осад та надосадову рідину в об'ємі 100 мкл за допомогою дозатора та наконечника з фільтром і переносили в нову пробірку на 1,5 мл (не з набору).

Змінювали рукавички на нові!

4. До 100 мкл матеріалу додавали 300 мкл *Lysis solution* та ретельно перемішували піпетуванням (10-12 разів).
5. Додавали 300 мкл 70% етанолу та ретельно перемішували піпетуванням.
6. Ставили необхідну кількість колонок (рожевого кольору) в пробірки без кришечок.
7. Переливали (або переносили піпеткою) весь лізат у колонку відповідно до маркування. Центрифугували 30 с за швидкості 12 тис об/хв. Виймали колонку з відмивочної пробірки та обережно, не розбризкуючи, виливали весь центрифугат у контейнер для рідких відходів. Повертали колонку на місце (в ту саму відмивочну пробірку).

Пункти з 8-го по 14-й однакові для всіх типів матеріалу.

II. Секційний матеріал (тканина легень):

1. Переносили 40 мг (близько 4x4 мм) подрібненої тканини легенів у пробірку на 2 мл з кришечкою. Велика кількість зразка дуже небажана, адже може спричинити засмічення колонки та зниження якості та кількості виділеної РНК, а також інгібіцію реакції ПЛР.
Змінювали рукавички на нові!
2. Після того, як тканина розморозилася, додавали 700 мкл *Lysis Solution* та ретельно перемішували піпетуванням і перемішували на вортексі, доводячи матеріал до стану клітинної суспензії (лізат).
3. Центрифугували лізат 3 хв за швидкості 12 тис. об/хв.
4. Переносили надосад (не зачіпаючи осад!) у чисту пробірку на 2 мл з кришечкою.
5. Додавали 700 мкл 70% етанолу та ретельно перемішували піпетуванням.
6. Ставили необхідну кількість колонок (рожевого кольору) у пробірки без кришечок.
7. Одразу після перемішування (поки лізат не розділився на водну та спиртову фази!) переносили 700 мкл лізату в колонку відповідно до маркування. Центрифугували 1 хв за швидкості 12 тис. об/хв. Виймали колонку з

відмивочної пробірки та виливали центрифугат у контейнер для рідких відходів. Повертали колонку на місце (у ту саму відмивочну пробірку).

Надалі послідовність дій однакова для всіх видів матеріалу:

8. У колонку вносили 700 мкл *Low stringency wash solution*. Центрифугували 30 с за швидкості 12 тис об/хв. Виймали колонку з відмивочної пробірки та виливали центрифугат у контейнер для рідких відходів. Повертали колонку на місце (у ту ж саму відмивочну пробірку).

9. У колонку вносили 700 мкл *High stringency wash solution*. Центрифугували 30 с за швидкості 12 тис. об/хв. Виймали колонку з відмивочної пробірки та виливали центрифугат у контейнер для рідких відходів. Повертали колонку на місце (у ту саму відмивочну пробірку).

10. У колонку вносили 700 мкл *Low stringency wash solution*. Центрифугували 1 хв за швидкості 12 тис. об/хв. Виймали колонку з відмивочної пробірки та виливали центрифугат в контейнер для рідких відходів. Повертали колонку на місце (у ту саму відмивочну пробірку).

11. Додатково центрифугували пробірки з пустими колонками 2 хв за швидкості 12 тис. об/хв з метою видалення залишку відмивочних розчинів.

12. Переносили колонки в чисті пробірки на 1,5 мл з кришечкою (з пакетика «1,5 ml capped») відповідно до маркування!

Змінювали рукавички на нові!

13. У колонку, не торкаючись мембрани, вносили 80 мкл *Elution solution* так, щоб розчин рівномірно розподілився на мембрані всередині колонки. Витримали 1 хв.

14. Центрифугували 2 хв за швидкості 12 тис. об/хв. Як результат, елюат, що містить очищену РНК, опинився в пробірці. Кришечку закрили, а колонку викинули в контейнер для твердих відходів.

Отримана РНК готова до реакції зворотної транскрипції. На час приготування суміші для зворотної транскрипції помістили виділену РНК в холодильник (температура +2-8 °С). Рекомендується провести реакцію зворотної транскрипції не пізніше, ніж через 40 хв після виділення РНК.

Проведення реакції зворотної транскрипції (ЗТ) за допомогою iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad

Компоненти набору:

1. *5x iScript reaction mix* - реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції.
2. *Nuclease-free water* - вода без нуклеази.
3. *iScript reverse transcriptase* фермент – зворотна транскриптаза або ревертаза.

Набір для синтезу кДНК *iScript* забезпечує швидке та просте рішення для двошагової ЗТ-ПЛР. Зворотна транскриптаза (РНКаза Н⁺) забезпечує велику чутливість при кількісній ПЛР. Фермент модифікований та отриманий з вірусу лейкозу мишей Молоні (МЛІВМ) транскриптаза, оптимізована для надійного синтезу кДНК при широкому динамічному діапазоні введеної РНК. Фермент, який використовується, попередньо змішаний з інгібітором РНКаз. Унікальна суміш оліго-(dT) та гексануклеотидних (random) праймерів у реакційній суміші *iScript* добре працює з різними мішенями.

Набір *iScript cDNA Synthesis Kit* зберігали за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реагенти розморожували максимально наближено до їх використання. Необхідно уникати зберігання реагентів за температури вищих за $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. *5x iScript reaction mix* при відтаюванні може утворювати незначний преципітат, що не впливає на роботу реагенту.

Порядок дій при приготуванні суміші для реакції ЗТ виконується в зоні приготування реакційної суміші за допомогою дозаторів, індивідуальних для цієї зони та наконечників із фільтрами.

1. Ставили у штатив та маркували необхідну кількість мікропробірок об'ємом 0,2 мл для проведення ЗТ досліджуваних зразків виділеної РНК.

Після того, як реагенти були розморожені, *5x iScript reaction mix* перемішували на вортексі та осаджували краплі з-під кришки пробірки шляхом короткого центрифугування. Реагент *iScript reverse transcriptase* не замерзає. Перед використанням центрифугували з метою струшування крапель з-під кришки пробірки та перемішували піпетуванням (не на вортексі!).

1. У пробірці об'ємом 1,5 мл типу «епендорф» з кришкою змішували компоненти реакційної суміші з розрахунку на одну реакцію (на одну мікропробірку) (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

**Розрахунок компонентів реакційної суміші для проведення
зворотної транскрипції**

iScript reaction mix	6 мкл
iScript reverse transcriptase	1,5 мкл
Nuclease-free water	15 мкл
Разом	22,5 мкл

2. Кількість реакцій відповідає кількості зразків виділеної РНК плюс один об'єм на врахування похибки дозатора.

3. Після змішування всіх реагентів у зазначених кількостях суміш перемішували на вортексі та осаджували краплі з-під кришки пробірки шляхом короткого центрифугування.

4. Періодично перемішували піпетуванням, вносили отриману суміш у промарковані мікропробірки по 22,5 мкл.

5. Переходили в зону виділення нуклеїнових кислот (у разі відсутності другого ПЛР-боксу, спеціально призначеного для внесення РНК/кДНК до реакційної суміші).

Внесення виділеної РНК до ЗТ-суміші.

1. Вносили по 7 мкл очищеної РНК у відповідні мікропробірки з реакційною сумішшю для ЗТ. Як позитивний контроль використовували зразок, позитивний за потрібними маркерами.

Виходячи з даних розрахунків, загальний об'єм реакції в одній мікропробірці буде дорівнювати: $22,5 + 7 = 29,5$ мкл.

Цього об'єму вистачить для проведення шістьох ПЛР-реакцій для даного зразка (на 6 маркерів). Якщо для даного зразка необхідно провести більшу кількість досліджень, то об'єм реакції ЗТ в одній мікропробірці можна подвоїти, збільшивши об'єм усіх компонентів вдвічі.

2. Запускали реакцію ЗТ на приладі iQ5, Bio-Rad. За наявності термоциклера реакцію ЗТ можна проводити у ньому.

Отримана в результаті ЗТ кДНК може зберігатися за температури -20°C протягом місяця та за -70°C – довготривало.

Проведення ампліфікації за допомогою набору iQ Supermix (Bio-Rad) та набору праймерів та зондів (Biosearch)

Для правильної ідентифікації вірусів грипу оптимальним є аналіз декількох цільових генів, які представлені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2.

Цільові гени для ідентифікації вірусів грипу методом ПЛР у реальному часі

№ п/п	Вірус грипу	Ген-мішень	Мета
1.	Вірус грипу типу А	<i>Inf A</i> (ген матричного білка)	для типування
2.	Вірус грипу типу В	<i>Inf B</i> (ген матричного білка)	для типування
3.	Вірус грипу субтипу А(Н1N1)	<i>H1</i> (ген гемаглютиніну)	для субтипуювання на рівні підтипу
4.	Вірус грипу субтипу А(Н1N1)pdm	<i>swA</i> (ген матричного білка пандемічного грипу) <i>swH1</i> (ген гемаглютиніну пандемічного грипу)	для субтипуювання на рівні підтипу
5.	Вірус грипу субтипу А(Н3N2)	<i>H3</i> (ген гемаглютиніну)	для субтипуювання на рівні підтипу
6.	Внутрішній контроль	<i>RnaseP</i> (ген рибонуклео-протеїну клітинного походження)	Для контролю правильного проведення етапу екстракції та зворотної транскрипції

Панель реагентів (Biosearch) для визначення вірусів грипу типів А та В методом ПЛР з детекцією в реальному часі складається з праймерів та зондів, що специфічно розрізняють генетичні маркери підтипів грипу А та В:

1) *Universal Influenza A*:

- прямий праймер (*InfA-F*) 5' d GACCRATCCTGTCACCTCTGAC 3';
- зворотний праймер (*InfA-R*) 5' d AGGGCATYTTGGACAAAKCGTCTA 3';
- зонд1 (*InfA-P*) послідовність (5'-3'): 5' d FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTG GGCACG-T(BHQ-1)-CRGTCACAATTGGARAA- Spancer C3 3';

2) *Asw*:

- прямий праймер (*InfAsw-F*) 5' d GTGKGCIGGGTTTTTCATTTGG TG 3';
- зворотний праймер (*InfAsw-R*) 5' d GACCRATCCTGTCACCTCTGAC 3';
- зонд2 (*InfAsw-P*) послідовність (5'-3'): 5'd FAM- CYACTGCAAGCCCA-T(BHQ-1)-ACACACAAGCAGGCA- SpancerC3 3';

3) *H1*:

- прямий праймер (*H1-F*) 5' d AAC TAC TAC TGG ACT CTR CTK GAA 3';
- зворотний праймер (*H1-R*) 5' d CCA TTG GTG CAT TTG AGK TGA TG 3';
- зонд (*H1-P*) 5'd FAM- TGA YCC AAA GCC(T-BHQ-1)CT ACT CAG TGC GAA AGC - Spancer C3 3';

4) *H1sw*:

- прямий праймер (*H1sw-F*) 5' d GTGCTATAAACACCAGCCTYCCA3';
- зворотний праймер (*H1sw-R*) 5' d CGGGATATTCCTTAATCCTGTRGC 3';
- зонд2 (*H1sw-P*) послідовність(5'-3'): 5'FAM- CAGAATATACA-T(BHQ-1)-CCRGTCACAATTGGARAA- Spancer C3 3';

5) *H3*:

- прямий праймер (*H3-F*) 5' d AAG CAT TCC YAA TGA CAA ACC3';
- зворотний праймер (*H3-R*) 5' d ATT GCR CCR AAT ATG CCT CTA GT3';
- зонд (*H3-P*) 5'd FAM- CFG GAT CFC ATA TGG GSC CTG TCC CAG-(BHQ-1) 3';

6) *Universal Influenza B*:

- прямиий праймер (*InfB-F*) 5' d TCC TCA AYT CAC TCT TCG AGC G3';
- зворотний праймер (*InfB-R*) 5' d CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG3';
- зонд (*InfB-P*) 5'd FAM-CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG-(BHQ-1) 3';

7) *PHKaза P*:

- прямиий праймер (*RP-F*) AGA TTT GGA CCT GCG AGC G;
- зворотний праймер (*RP-R*) GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT;
- зонд (*RP-P*) 5'FAM- TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG- (BHQ-1) 3'.

Панель реагентів складається з праймерів та зондів, які розрізняють генетичні сигнатури різних патогенних штамів. Ця панель складається з подвійно-міченого BHQ зонду, прямого та зворотного праймеру для детекції на приладі ПЛР у реальному часі вірусних штамів грипу.

Усі зонди мічені FAM і Black hole Quencher (BHQ) барвниками. Усі зонди та праймери очищені методом високоефективної рідинної хроматографії (*HPLC-high-performance liquid chromatography*).

Зонди, що використовувались, мали таку будову:

1. Зонди TaqMan® відмічені на 5'-кінці репортерною групою – 6-карбоксіфлуоресцеїну (FAM) та гасителем, Black hole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Новато, Каліфорнія) на 3'-кінці.
2. Зонди TaqMan® відмічені на 5'-кінці репортерною групою – 6-карбоксіфлуоресцеїну (FAM) та гасяться внутрішньо на модифікованому "T" залишку за допомогою BHQ1, за допомогою модифікованого 3'-кінця для попередження нарощування зонду Таq-полімеразою.

Приготування реакційної суміші для ПЛР виконували в зоні приготування реакційної суміші за допомогою дозаторів, індивідуальних для цієї зони, та наконечників із фільтрами.

Реагент iQ Supermix стабільний за температури –20 °C протягом року. Слід уникати повторних циклів заморожування – відтаювання. За температури 4 °C реагент iQ Supermix стабільний протягом 6 місяців.

Необхідні реагенти, що не включені до набору:

Безнуклеазна вода (вода для ПЛР-реакцій).

Порядок дій:

1. Розморозували реагент iQ Supermix (якщо він зберігався в морозильній камері) за температури +4 °C чи при кімнатній температурі.
2. Брали з холодильника (+4 °C) необхідні системи «праймер-зонд» в залежно від того, на які маркери будуть тестуватися досліджувані зразки. При цьому кожен зразок повинен пройти тестування на внутрішній контроль (РНКза-Р).

Необхідно зауважити, що первинне дослідження зразка проводили, починаючи тестування його на наявність типоспецифічних маркерів вірусів грипу типів А та В, а потім, при отриманні позитивного результату, проводили подальше субтипуювання вірусу грипу типу А, що дозволить значно скоротити витрати на проведення первинного скринінгу.

Праймери та зонди для повсякденної роботи зберігали в холодильнику за +4 °C.

Розмороження реагентів починали максимально наближено до моменту приготування суміші.

3. При роботі з 96-луночним планшетом мікропробірки не потрібно готувати. При роботі з мікропробірками готували необхідну кількість мікропробірок об'ємом 0,2 мл (кількість потрібних мікропробірок розраховували, виходячи з кількості досліджуваних зразків та контролів, а також кількості досліджень для кожного зразка).
 4. Маркували пробірки типу «епендорф» (1,5 мл) для приготування ПЛР-суміші для кожної із систем «праймер-зонд». Кількість пробірок відповідала кількості систем «праймер-зонд», потрібних для дослідження.
 5. Розраховували об'єм компонентів для кожної із систем «праймер-зонд» на заплановану кількість досліджень (таблиця 2.3).
- Отриману суміш ретельно перемішували на вортексі та струшували краплі з кришок пробірок шляхом короткого центрифугування.

Приготування ПЛР-суміші для кожної із систем «праймер-зонд»

Компоненти	Об'єм на 1 реакцію, мкл	Об'єм на N реакцій, мкл
iQ Supermix	12,5	12,5 x N
Прямий праймер (f)	0,5	0,5 x N
Зворотний праймер (r)	0,5	0,5 x N
Зонд (p)	0,5	0,5 x N
Безнуклеазна вода	7	7 x N
Разом	21 мкл	21 N

7. Розносили отриману суміш по 21 мкл у відповідні лунки планшета або мікропробірки, уникаючи утворення бульбашок та не залишаючи крапель на стінках.
8. Переходили в зону виділення нуклеїнових кислот (у разі відсутності другого ПЛР-боксу, спеціально призначеного для внесення РНК/кДНК до реакційної суміші).
9. Вносили по 4 мкл кДНК у лунки планшета або мікропробірки. Як позитивний контроль використовували зразок, позитивний за потрібними маркерами та РНКазою Р.
10. Переходили в зону ампліфікації. Запускали реакцію ПЛР на приладі iQ5, Bio-Rad.

Інтерпретація результатів

У негативному контролі етапу виділення РНК та етапу ПЛР зростання флюоресценції повинне бути відсутнє. Присутність ампліфікаційного сигналу в негативних контролях свідчить про контамінацію реагентів чи приміщень.

1. В усіх клінічних зразках спостерігався позитивний сигнал за РНКазою Р. При цьому ампліфікаційна крива перетинала порогову лінію не пізніше 37-го циклу, що свідчить про прийнятну якість зразка. Відсутність ампліфікаційного сигналу за РНКазою Р може свідчити:

- а) про відсутність чи недостатню кількість клітин у клінічному матеріалі через неправильний забір або неналежне зберігання/транспортування;
- б) втрата РНК під час екстракції;
- в) присутність інгібіторів ПЛР-реакції у клінічному зразку;
- г) помилки при збиранні реакційної суміші для ЗТ чи ПЛР;
- д) неправильний вибір температурного протоколу.

2. У позитивному контролі ПЛР спостерігалися позитивні сигнали від відповідних маркерів. При цьому ампліфікаційні криві перетинали порогову лінію не пізніше 37-го циклу. Відсутність позитивного сигналу в одній або в усіх лунках позитивного контролю свідчать:

- а) про неналежну підготовку та проведення реакції;
- б) деградацію позитивного контролю.

3. У випадку відповідності вимогам контрольних зразків та позитивної реакції за РНКазою Р, переходили до аналізу результатів досліджуваних зразків:

- Зразок вважався позитивним щодо наявності маркера вірусу грипу типу А, якщо для нього була присутня характерна крива ампліфікації у лунці *InfA*, що перетинала порогову лінію не пізніше 37-го циклу.
- Зразок вважався позитивним щодо наявності маркера вірусу пандемічного грипу типу *A/H1sw*, якщо для нього спостерігалися характерні криві ампліфікації в лунках *InfA ma InfAsw i/або H1sw*, які перетинали порогову лінію не пізніше 37-го циклу.
- Зразок вважався позитивним щодо наявності маркера вірусу сезонного грипу типу *A/H1*, якщо для нього спостерігались характерні криві ампліфікації в лунках *InfA ma H1*, які перетинали порогову лінію не пізніше 37-го циклу.

- Зразок вважався позитивним щодо наявності маркера вірусу грипу типу *A/H3*, якщо для нього спостерігались характерні криві ампліфікації в лунках *InfA та H3*, які перетинали порогову лінію не пізніше 37-го циклу.
- Зразок вважався позитивним щодо наявності маркера вірусу грипу типу *B*, якщо для нього була присутня характерна крива ампліфікації у лунці *InfB*, що перетинала порогову лінію не пізніше 37-го циклу.
- Зразок вважався негативним, якщо жоден із маркерів не виявляв зростання флюоресценції у вигляді характерної ампліфікаційної кривої за умови наявності позитивного сигналу за *PHКазою P* для даного зразка та відповідності вимогам усіх контрольних зразків.

2.2.2 Виявлення інших збудників ГРВІ за допомогою набору «ОРВИ - скрин» (Амплиценс, Россия)

Тест-система «ОРВИ скрин» використовується для виявлення РНК респіраторно-синцитіального вірусу (*human Respiratory Syncytial virus - hRSv*), метапневмовірусу (*human Metapneumovirus - hMpv*), вірусів парагрипу 1, 2, 3 та 4 типів (*human Parainfluenza virus-1-4 - hPiv*), коронавірусів видів OC43, E229, NL63, HKUI (*human Coronavirus - hCov*), риновірусів (*human Rhinovirus - hRv*), ДНК аденовірусів груп В, С й Е (*human Adenovirus - hAdv*) і бокавірусу (*human Bocavirus - hBov*).

Загальний об'єм реакційної суміші – 25 мкл, включаючи об'єм проби кДНК – 10 мкл.

1. Відібрала необхідну кількість епандорфів із ПЦР-сумішню-1-FL відповідного найменування (таблиця 2.4) для ампліфікації кДНК за кількістю досліджуваних та контрольних проб.
2. На поверхню воску вносила по 7 мкл ПЦР-суміші-2-FL, при цьому вона не повинна провалюватися під віск та змішувалась с ПЦР-сумішню-1-FL.
3. У підготовлені епандорфи вносила по 10 мкл проб кДНК, отриманих у реакції зворотної транскрипції РНК.

4. Поставила контрольні реакції (для кожного найменування ПЦР-суміші-1-FL):
- а) негативний контроль ПЛР (К-) – вносила в епендорф 10 мкл ТЕ-буфера;
 - б) позитивний контроль ПЛР (К+) – вносила в епендорф 10 мкл ПКЗ (табл. 2.4);
 - в) позитивний контроль ПЛР ВКЗ STI-гес (ВК+) – вносила в епендорф 10 мкл ПКЗ STI-88;
 - г) негативний контроль екстракції (НК) – вносила в епендорф 10 мкл проби, виділеної з НКЗ.
5. Провела коротке центрифугування на вортексі (1-2 с) для появи осаду в реакційній суміші.

Таблиця 2.4

**Відповідність найменування ПЦР-суміші-1-FL
та позитивних контрольних зразків ампліфікації збудників ГРВІ**

Найменування ПЦР-суміші-1-FL	Найменування позитивних контрольних зразків ампліфікації збудників ГРВІ
<i>hRSv - hMpv</i>	ПКЗ кДНК <i>hRSv - hMpv</i>
<i>hAdv - hBov</i>	ПКЗ ДНК <i>hAdv - hBov</i>
<i>hRv</i>	ПКЗ кДНК <i>hRv</i>
<i>hPiv 1/3</i>	ПКЗ кДНК <i>hPiv 1/3</i>
<i>hPiv 2/4</i>	ПКЗ кДНК <i>hPiv 2/4</i>
<i>hCov</i>	ПКЗ кДНК <i>hCov</i>

Аналіз та інтерпретація результатів

Аналіз результатів проводиться за допомогою програмного забезпечення приладу, що використовується (iQ5 (Bio-Rad, США) (таблиця 2.5).

Результати інтерпретуються при наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції на кожному з використаних каналів із встановленою на

відповідному рівні пороговою лінією. Це визначає наявність або відсутність для даної проби кДНК/ДНК значення порогового циклу *Ct* у відповідній графі.

Таблиця 2.5

Програма ампліфікації ГРВІ - скрін

Прибор iQ5 (Bio-Rad, США)			
Цикл	Температура, С°	Час	Кількість циклів
1	95	5 хв	1
2	95	10 с	10
	54	25 с	
	72	25 с	
3	95	10 с	35
	54	25 с Детекція флуоресцентного сигналу	
	72	25 с	

Принцип інтерпретації результатів такий (таблиця 2.6):

- ДНК/РНК збудника ГРВІ **виявлена**, якщо для даної проби в таблиці результатів по відповідному каналу, визначено значення порогового циклу *Ct*. При цьому крива флуоресценції даної проби повинна перетинати порогову лінію на ділянці характерного експоненціального підйому флуоресценції.

Таблиця 2.6

Відповідність найменування ПЦР-суміші-1-FL

та каналів детекції збудників ГРВІ

Найменування ПЦР-суміші-1-FL	Детекція по каналу		
	FAM	HEX	ROX
<i>hRSv - hMpv</i>	ВК3 STI-rec	<i>hRSv</i>	<i>hMpv</i>
<i>hAdv - hBov</i>	ВК3 STI-rec	<i>hBov</i>	<i>hAdv</i>
<i>hRv</i>	ВК3 STI-rec	-	<i>hRv</i>
<i>hPiv 1/3</i>	ВК3 STI-rec	<i>HPiv 3</i>	<i>hPiv 1</i>
<i>hPiv 2/4</i>	ВК3 STI-rec	<i>hPiv 2</i>	<i>hPiv 4</i>
<i>hCov</i>	ВК3 STI-rec	<i>NL-63, 229E</i>	<i>HKU-1, OC 43</i>

- ДНК/РНК збудника ГРВІ **не виявлена**, якщо для даної проби в таблиці результатів по відповідному каналу не визначено (відсутнє) значення порогового циклу C_t (крива флуоресценції не перетинає порогову лінію), а в таблиці результатів по каналу для флуорофору FAM визначено значення порогового циклу C_t , що не перевищує вказане (граничне) значення.
- результат аналізу вважається **невалідним**, якщо для даної проби не визначено (відсутнє) значення порогового циклу C_t по відповідному каналу детекції збудників ГРВІ (таблиця 2.6) та по каналу FAM значення C_t також відсутнє або перевищує вказане граничне значення. У цьому випадку потрібно повторно провести ПЛР-дослідження відповідного клінічного зразка з етапу екстракції ДНК/РНК.

2.2.3 Ізоляція виявлених вірусів грипу на культурі клітин MDCK та MDCK-SIAT

На сьогодні найбільш чутливою культурою клітин до вірусів грипу є MDCK та MDCK-SIAT. Культура клітин (КК) MDCK зберігає високу чутливість до вірусів грипу А та В на протязом 60-80 пасажів. Вірусологічні дослідження для ізоляції та накопичення вірусів на чутливій культурі клітин проводилися з метою їх подальшого сиквенування.

MDCK-SIAT – це клітини, що були трансформовані за допомогою людського ферменту CMP-N-ацетилнейрамінат: β -галакциду, що каталізує α -2,6-сіалізацію галактози на глікопротеїнах або глікопротеїдах. Ці додаткові рецептори повинні збільшити кількість зв'язків між віріонами вірусу 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.

Важливо зазначити, що HA-1 домен гену гемаглютиніну був генетично стабільний після проведення кількох пасажів MDCK-SIAT клітин, що не завжди трапляється на MDCK клітинах. Досліди показали, що титр вірусів А(H3N2) та

В, але не А(Н1N1), був значно більший на КК MDCK-SIAT, ніж на звичайній, батьківській. Також відносно більшу чутливість до цієї нової КК має вірус грипу типу А(Н5N1), але не набагато.

Отже, MDCK-SIAT клітинна лінія перевершує за чутливістю звичайні клітини MDCK для виділення вірусу грипу людини з клінічних зразків, і можуть бути надзвичайно корисні для спостереження, діагностичних та дослідницьких цілей.

Таким чином, використання трансформованих КК може бути альтернативою для культивування та ідентифікації вірусів грипу.

Для роботи з культурою клітин необхідні такі середовища та реагенти:

1. DMEM або Ігла MEM з подвійним набором амінокислот та вітамінів плюс глютамін.
2. Теляча ембріональна сироватка.
3. Антибіотики (пеніцилін та стрептоміцин).
4. Трипсин.
5. Розчин Хенкса.
6. Телячий сироватковий альбумін.
7. NEPES (сольовий розчин).

Для культивування та субкультивування КК необхідні такі середовища та розчини, які готувалися безпосередньо перед проведенням досліджень:

Ростове середовище: до середовища DMEM додавали телячу ембріональну сироватку, глютамін, антибіотики (пеніцилін та стрептоміцин).

Розчин трипсину: до дистильованої води додавали трипсин. Фільтрували розчин через 0,1 мкм мембранний фільтр. Робили аліквоти по 1мл. Зберігали за -20°C. Розчин трипсину в такому вигляді можна зберігати протягом 2 років від дати приготування.

Розчин Хенкса з трипсином (для промивання к/кл): до розчину Хенкса додавали приготований розчин трипсину (2 мкг/мл кінцева концентрація).

DMEM підтримуюче середовище + трипсин: до середовища DMEM додавали: глютамін (2 мМ кінцева концентрація), антибіотики (пеніцилін та

стрептоміцин), ТСА (телячий сироватковий альбумін), HEPES (сольовий розчин).

Для запобігання старіння культури клітин і зниження її чутливості до вірусів грипу кожні 4-7 днів проводили субкультивування. Із флакона з моношаром клітин MDCK / MDCK-SIAT видаляли ростове середовище. За допомогою розчину трипсину EDTA легким покачуванням протягом однієї хвилини відмивали моношар культури клітин. Промивання проводили тричі. Після цього вносили розчин трипсину в об'єм, який тільки покриває моношар клітин, і ставили в термостат (37 °C) на 30 хв і більше до повного сповзання клітин.

Після появи сповзання клітин для припинення подальшої дії ферментів у флакон вносили ростове середовище, піпетували та розливали по флаконах (пробірках) і ставили в термостат (37 °C) для росту моношару [125].

Для зараження культури клітин до 100 мл підтримуючого середовища додавали 0,2 мл розчину трипсину (2 мкг/мл кінцева концентрація). Цей розчин був придатний для використання лише протягом одного робочого дня. Розчин трипсину необхідний для розщеплення гемаглютиніну, що призводить до кращої адсорбції вірусу на поверхні клітини.

Для первинного зараження використовували пробірки з моношаром культури клітин MDCK (конфлюентність 80-90%). Із пробірок видаляли ростове середовище й тричі промивали клітини 1,0 мл розчину Хенкса з трипсином, яке видаляли. Потім на моношар 2 пробірок вносили по 0,2 мл змиву від хворого. Інкубували 30-60 хв при 34 °C. Далі у всі пробірки вносили по 0,8 мл підтримуючого середовища з доданим трипсином й інкубували за 34 °C в термостаті (бажано з подачею 5% CO₂), контролюючи кожного дня стан моношару.

Зазвичай на 2-4-й день можливо зробити контроль за допомогою РГА. За відсутності вираженої ЦПД і негативного результату РГА проби витримували до 7 днів, потім заморожували-розморозували (руйнували клітини для виходу

накопиченого вірусу в культуральну рідину) за температури нижче -70°C . Проводили РГА, а після цього проводили наступний пасаж.

При вираженій ЦПД і позитивній РГА проба вважається позитивною і наступним етапом було закріплення й накопичення вірусу у великому об'ємі. Між зараженнями проби зберігали за температури -70°C і нижче.

Накопичення вірусів проводили в культуральних флаконах із моношаром клітин MDCK, площиною 25 см^2 (і більше). Культуру клітин відмивали двічі основним середовищем в об'ємі 5 мл, а потім вносили вірусомісну рідину в об'ємі 0,5 мл (зазвичай використовують розведення, ступінь якого залежить від вихідного титру). Наприклад, титр вірусу після первинного зараження 1:2 – можна використовувати без розведення, а титр 1:32 – розведення 1:10 і вище).

Обережно, легкими покачувальними рухами розподіляли вірусомісну рідину на поверхні моношару клітин і залишали на інкубацію за 34°C на 30-60 хв, періодично покачуючи. Після цього додавали підтримуюче середовище в об'ємі 10-12 мл і залишали в термостаті (34°C), контролюючи наявність ЦПД [125].

При чітко вираженій ЦПД (розрив моношару, закруглення й сповзання клітин) клітини переносили в центрифужні пробірки й центрифугували при 1500-2000 об/хв 10-15 хв. Відібраний супернатант використовували для типування в РГГА з грипозними діагностичними сироватками та передачі до Світового центру контролю за інфекціями (CDC, Атланта) для подальшого аналізу.

2.2.4 Визначення типоспецифічності ізольованих вірусів методом РГГА

Для визначення титру вірусу проводили реакцію гемаглютинації (РГА). Для постановки РГА необхідні: вірусомісний матеріал, суспензія еритроцитів (морської свинки, людської крові I групи чи півня), фізіологічний розчин. Спочатку готували дворазове розведення вірусу. Потім методом перекату його

титрували від 1:2 до 1:1024. Для цього в ряд лунок наливали фізіологічний розчин. Потім до лунки 1 вносили вірусомісний матеріал, піпетували й переносили до 2 і далі до потрібного розведення. З останньої лунки частину суміші видаляли в дезінфікуючий розчин. Гемаглютинація залежить від температури та рН середовища. Час завершення аглютинації неоднаковий. В нашому випадку 20 хв за кімнатної температури. Протягом РГА виділяють фазу адсорбції вірусу на еритроцитах, фазу аглютинації агрегатів вірусу з еритроцитами та елюції вірусу з еритроцитів.

Облік результатів реакції здійснювали за трихрестовою системою. За титр вірусу вважали те найбільше його розведення, при якому спостерігалася позитивна реакція гемаглютинації [126].

Визначивши в реакції гемаглютинації титр вірусу, ми готували робочу дозу антигену, яка дорівнювала чотирьом титрам вірусу. Після приготування робочої дози контролювали в ній вміст вірусу. Для цього в чотири лунки вносили фізіологічний розчин, у першу лунку додавали такий самий об'єм приготованої робочої дози антигену, і розбавляли двічі в кожній наступній лунці всього – чотири лунки. Потім в кожну лунку додавали такий самий об'єм 1% суспензії еритроцитів морської свинки. Через 20 хв визначали кількість вірусу в робочій дозі.

Після приготування робочої дози вірусу розбавляли сироватки з метою визначення типо- та штамоспецифічних антитіл в них до вірусу грипу. Спочатку сироватки розводили 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 в дезінфікуючий розчин. Далі в кожну лунку з розведеною сироваткою додавали по одному об'єму робочої дози вірусу. Планшет накривали кришкою й залишали в термостаті на 20 хв для сполучення вірусу з антитілами. Після інкубації додавали по одному об'єму в кожну лунку 1% суспензію еритроцитів і залишали ще на 20 хв у термостаті. Після цього

проводили облік результатів реакції. Титром сироватки вважали останнє її розведення, у якому спостерігали гальмування гемаглютинації [127].

2.2.5 Побудова філогенетичних дерев за допомогою програми MEGA 6.0

Для проведення філогенетичного аналізу (встановлення філогенетичної спорідненості) вірусів грипу, виділених протягом 2009-2015 рр., ми застосували підходи та методи молекулярної філогенії. Щоб визначити філогенетичні взаємовідносини між житомирськими ізолятами й вакцинними та референс-штамами, нами були побудовані філогенетичні дерева, що являють собою проєкцію у двовимірному просторі складних багатовимірних співвідношень між послідовностями біологічних молекул [128]. При побудові філогенетичних дерев був вибраний адитивний тип останніх [129], який має перевагу збереження реальних відстаней між організмами, що виражені в довжинах гілок. Також мутаційні події для вірусів грипу відбувались за відносно короткий проміжок часу й застосування ультратричного підходу побудови дерев не несло б ніякого додаткового інформативного навантаження [128].

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*). Вирівнювання послідовностей проводили із застосуванням алгоритму ClustalW [130].

Філогенетичні дерева будували в програмі MEGA 6.0 [131]. Еволюційні зміни досліджували методом аналізу дискретних ознак – Maximum Likelihood (ML) [131]. Для вибору оптимальної моделі з 12 доступних користувались відповідною опцією в програмі MEGA 6.0.

2.2.6 Статистична обробка результатів

Для статистичної оцінки значущості отриманих результатів застосовували метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з кількістю реплікацій 100-1000 [132]. Для вирішення питання про значущість вибірових показників та оцінки вірогідності відмінностей між одержаними показниками результати були оброблені статистичним методом [133].

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

$$m_p = \frac{\sqrt{P(100-P)}}{n} \%,$$

де, m_p - середня похибка у відсотках;

P - одержана частота ознаки, що вивчається у відсотках;

n - кількість спостережень у даному досліді.

2. Середнє арифметичне значення розраховували за формулою

$$X_{cp} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X_i}{n}.$$

Розмах варіації характеризує ступінь варіації даної ознаки:

$$R = X_{max} - X_{min}.$$

3. Для розрахунку ступеня відхилення середнього значення отриманої вибірки, визначали середньоквадратичний відхил за формулою:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{cp})^2}{n - 1}},$$

де X_i - значення варіантів вибірки;

X_{cp} - середнє значення;

n - розмір вибірки.

4. Середню похибку середньої величини розраховували за формулою

$$m = \frac{S_x}{\sqrt{n}}.$$

Крім цих методів було використано можливості програмного забезпечення Microsoft Excel та MEGA 6.0 [131].

РОЗДІЛ 3 РЕТРОСПЕКТИВНИЙ АНАЛІЗ ЗАХВОРЮВАНOSTІ НА ГРИП ТА ІНШІ ГРІ НАСЕЛЕННЯ ЖИТОМИРСЬКОЇ ОБЛАСТІ ЗА ПЕРІОД З 1999 ДО 2015 РР.

4.1 Аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ населення Житомирської області

На першому етапі нами був проведений ретроспективний аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ населення Житомирської області з 1999 до 2015 рр. з метою вивчення сезонності й циклічності цих хвороб.

Динаміка захворюваності на грип за період з 1999 до 2015 рр. у Житомирській області, як і в Україні в цілому, характеризується певною циклічністю – підйомами, що змінюються спадами. На нашу думку, це пов'язано зі станом популяційного імунітету та змінами в антигенних та генетичних детермінантах збудника (дрейф та шифт).

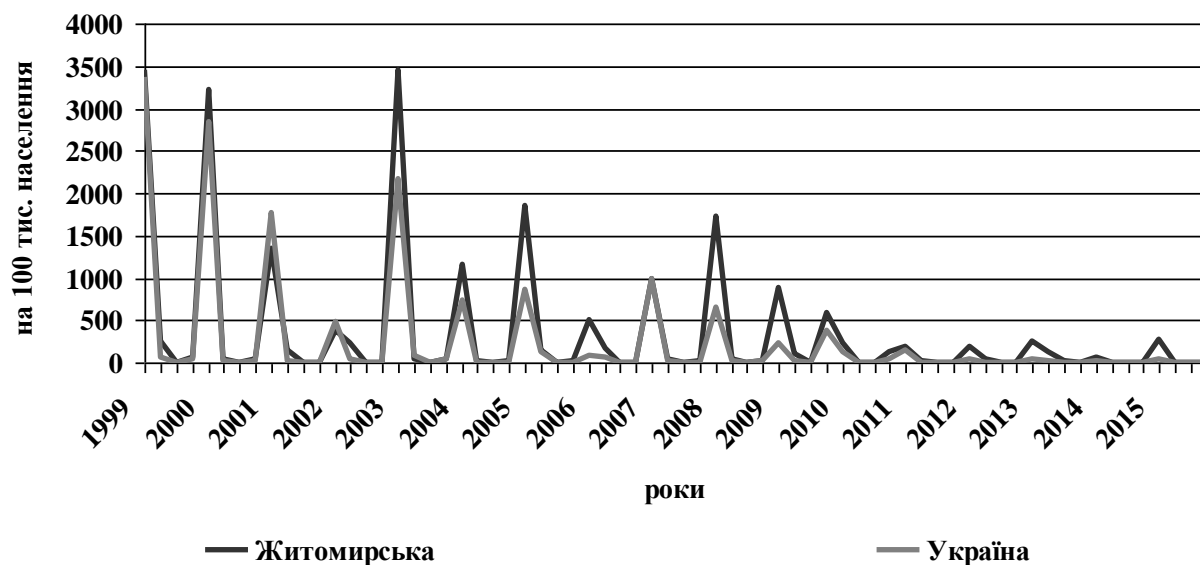


Рис. 3.1 Динаміка захворюваності на грип населення Житомирської області та України в цілому за період з 1999 до 2015 рр. поквартально (на 100 тис. населення)

В результаті проведення ретроспективного аналізу епідемічного процесу грипу в Житомирській області протягом 17 календарних років було виявлено його згасання. Інтенсивні показники по області становили від 3754,7 на 100 тис. населення (1999) до 285,68 на 100 тис. населення (2015). Показники захворюваності на грип майже збігаються з перебігом захворюваності по області та в Україні в цілому. Цей факт може бути пов'язаний зі зміною соціально-економічних чинників у нашій країні (зростання безробіття, зміни форм власності, зменшення чисельності населення), що суттєво вплинуло на зниження кількості звернень населення за медичною допомогою, отже, призвело до зниження інтенсивного показника реєстрованої захворюваності.

У Житомирській області, як і в Україні в цілому, щорічно реєструються сезонні епідемічні підйоми грипу. Грип – єдина респіраторна інфекція, яка має чітко виражену сезонність.

Підйоми, що відбувалися протягом останніх 17 років спостереження, були незначні, навіть у 2008 та 2009 рр. (інт. показник 2092,17 - 1595,75 на 100 тис. населення відповідно) був менший за такий на початку спостереження. На тлі відносного епідеміологічного благополуччя попередніх років у 2009 р. розгорнулася пандемія, яка викликала неабияку зацікавленість до проблеми грипу своїми особливостями. Вона була викликана новим за антигенними властивостями вірусом грипу А(Н1N1). В епідемічний процес були залучені особи працездатного віку від 21 до 50 років, тобто молоде неімунне покоління. В усьому світі очікували дуже високу кількість випадків захворювання на грип (особливо летальних), приблизно таку, як при пандемії 1918-1919 рр. Тому, що пандемічний вірус Н1N1 2009 року містить ген гемаглютиніну (НА), який походить від класичної Н1N1 свинячої лінії та антигенно схожий з вірусом грипу 1918 р. Пандемія ХХІ століття виявилася значно легшою, ніж очікувалося, а летальність порівнювалася із сезонними епідеміями грипу. Як видно з рис. 3.2 протягом останніх шести років після пандемії епідемічна ситуація стабілізувалась як в Житомирській області, так і в Україні в цілому.

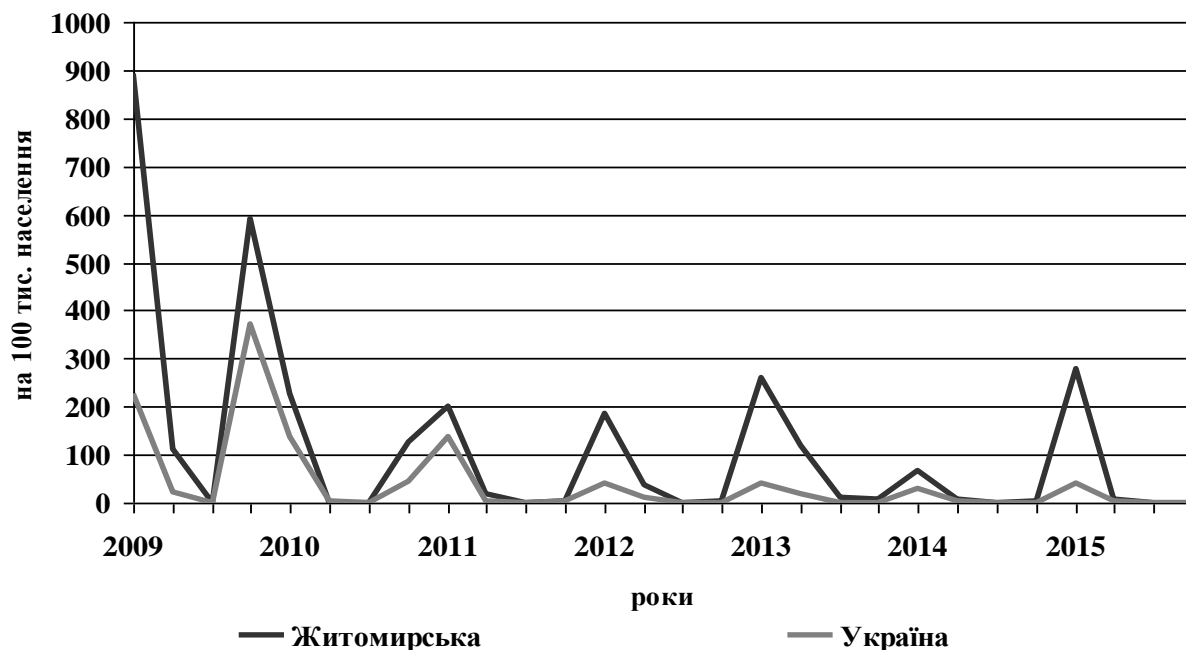


Рис. 3.2 Динаміка захворюваності на грип населення Житомирської області та України в цілому за період з 2009 до 2015 рр. поквартально (на 100 тис. населення)

Аналізуючи поквартальну динаміку захворюваності на грип населення Житомирської області кожного календарного року з 1999 до 2015 рр. можна зазначити, що вона реєструвалася на території області протягом всіх календарних років нашого спостереження із чітко вираженою сезонністю. Зростання захворюваності припадає на зимово-весняний період (січень-березень).

Найбільші показники захворюваності населення на грип протягом 1999-2015 рр. були в I кварталі (1734,49 на 100 тис. – 2008 р.; 1857,46 на 100 тис. – 2005 р.; 3457,83 за 100 тис. – 2003 р.; 637,52 на 100 тис. – 2001 р.; 3219,58 на 100 тис – 2000 р.; 3462,05 на 100 тис. – 1999 р.) (рис. 3.1). Підвищення захворюваності пов'язане з виходом школярів та студентів після канікул (великі скупчення людей сприяють розповсюдженню інфекції), після чого збільшується рівень захворюваності населення не тільки на грип, але ще й на інші ГРІ.

У 2009 р. ми спостерігали високі показники захворюваності на грип

(592,63 на 100 тис.) в IV кварталі, які більш ніж у 50 разів перевищували такі показники в препандемічних роках (11,91 на 100 тис. – 2008). У літній час відзначається значне зниження захворюваності населення на грип. По-перше, це пов'язано з прямою залежністю захворюваності на грип від температури довкілля – вірус грипу добре зберігається за низьких температур, а по-друге – з підвищенням неспецифічного імунітету у населення. Безперервність епідеміологічного процесу також пояснює те, що у північній півкулі захворювання виникає в осінньо-зимовий період (листопад-березень), а в південній півкулі – квітень-жовтень. Таким чином, виникає переміщення вірусів грипу з однієї півкулі у другу. Також існує гіпотеза про персистування вірусів грипу в організмі перехворілої людини, що в разі зниження імунітету може викликати захворювання.

Захворюваність на інші ГРІ населення Житомирської області, як і України в цілому, на відміну від захворюваності на грип, реєструється протягом всього календарного року із зростанням в IV та I кварталах. У цілому захворюваність на інші ГРІ знаходиться на одному рівні (3.1, 3.2, 3.3).

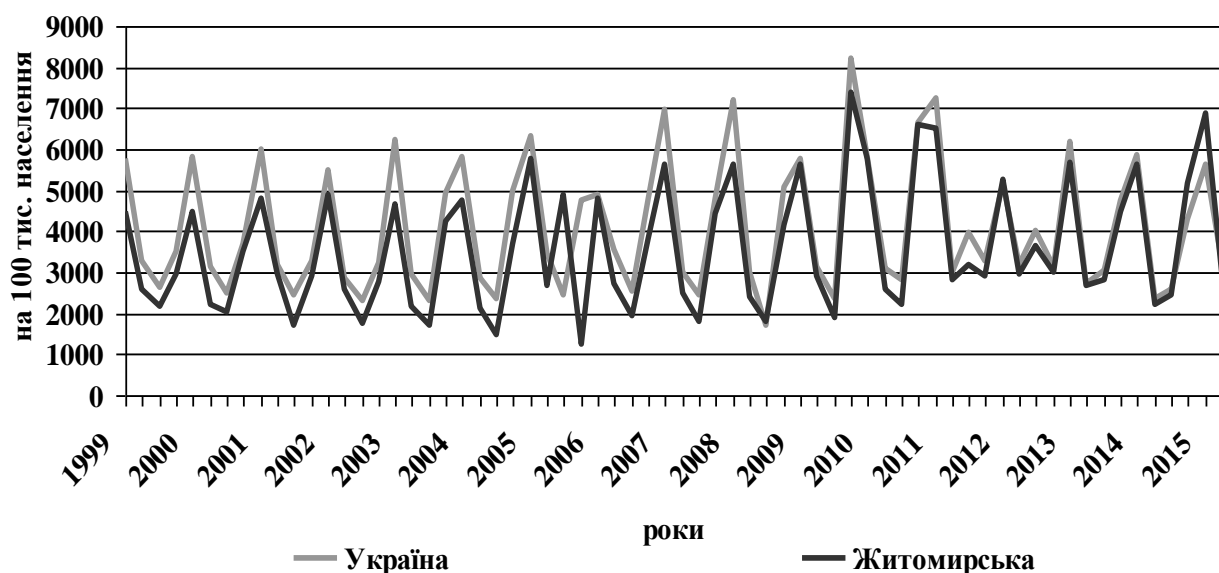


Рис. 3.3 Динаміка захворюваності на інші ГРІ населення Житомирської області та України в цілому за період з 1999 до 2015 рр. поквартально (на 100 тис. населення)

Найбільші показники захворюваності населення на інші ГРІ протягом 1999-2015 рр. спостерігались в I кварталі (5784,1 на 100 тис. – 2010 р.; 6510,32 на 100 тис. – 2011 р.; 6886,43 на 100 тис. – 2015 р.).

У 2010 та 2011 рр. в I кварталі ми спостерігали великий інтенсивний показник захворюваності не тільки на грип, але ще й на інші ГРІ. Дана ситуація склалась внаслідок появи в 2009 р. нового пандемічного вірусу грипу А(Н1N1)рdm. У ці роки вірус продовжив своє поширення, що відобразилося на популяційному імунітеті населення не тільки Житомирської області, а й України в цілому. Лише в 2015 р. захворюваність на інші ГРІ була висока завдяки ко-циркуляції в Житомирській області вірусів грипу А(Н1N1)рdm, А(Н3N2) та В.

Якщо порівнювати захворюваність на інші ГРІ населення Житомирської області з такою по Україні в цілому то з рис 3.3, ми спостерігаємо, що інтенсивні показники Житомирської області менші за показники України в цілому. Але в 2015 р. він був вищий (6886,43 на 100 тис. – Житомирська область та 5618,67 на 100 тис. – Україна) [2, 9, 134].

3.2 Порівняльний аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ населення Житомирської області в розрізі районів

В області налічується 23 адміністративні райони, 11 міст, серед них 5 міст обласного підпорядкування (Житомир, Бердичів, Коростень, Малин, Новоград-Волинський), 43 селища міського типу і 1613 сільських населених пунктів. Обласний центр – місто Житомир.

Для зручності демонстрації аналізу захворюваності на грип населення у 23 районах Житомирської області для досліджень ми взяли дані трьох великих за чисельністю населення районів (Житомирський (68,0 тис. осіб), Овруцький (60,7 тис. осіб), Новоград-Волинський (48,7 тис. осіб)), трьох малих (Брусилівський (16,1 тис. осіб), Лугинський (17,9 тис. осіб), Народицький (9,6

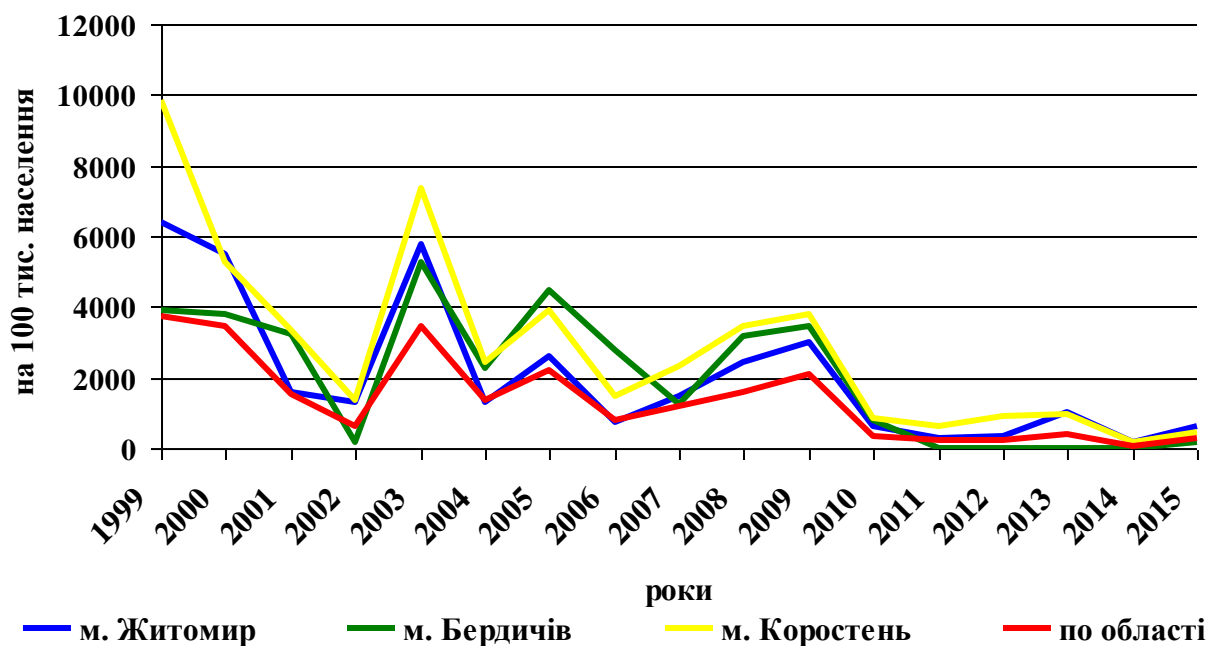
тис. осіб)) та трьох великих міст (м. Житомир (270,5 тис. осіб), м. Бердичів (79,3 тис. осіб), м. Коростень (65,7 тис. осіб)).

Найбільші показники захворюваності на грип населення серед представлених районів спостерігали в Новоград-Волинському та Овруцькому районі (рис. 3.4, б), а найнижчі в Брусилівському (рис. 3.5, а). Серед великих міст області найбільші показники – в місті Коростень (рис. 3.4, а).

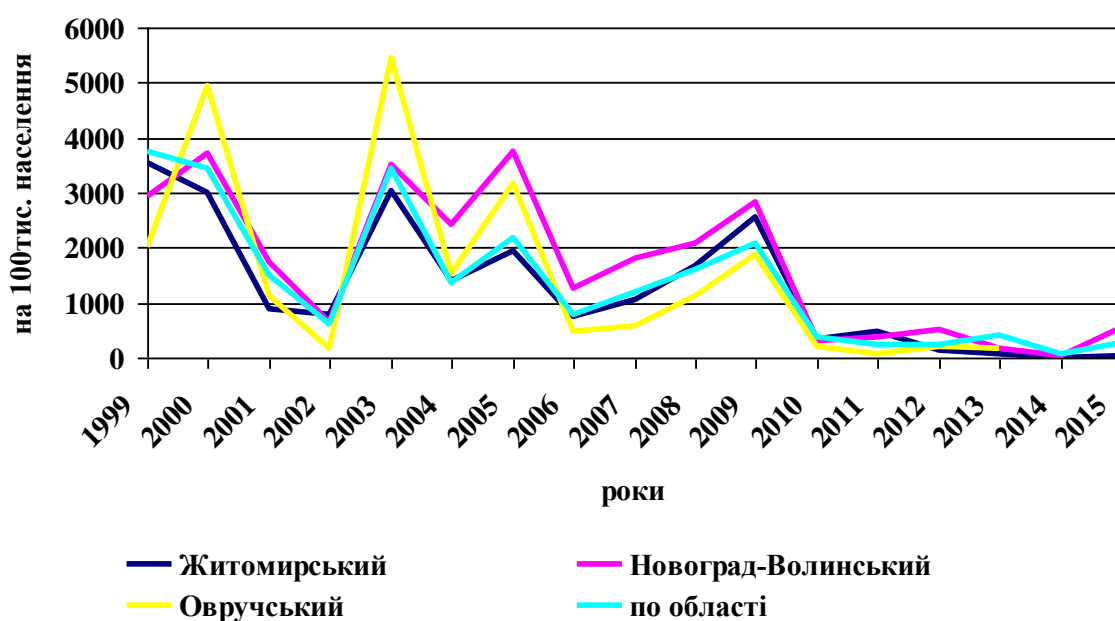
Показники захворюваності на грип населення в досліджуваних районах майже збігаються з перебігом захворюваності по Житомирській області в цілому, а в деяких роках були з перевищенням приблизно у 1,5 раза. У 2000 та 2003 рр. найвищі показники захворюваності населення на грип були в Овруцькому районі (4941 та 5453,5 на 100 тис. населення відповідно). У 2005 та 2009 рр. найвищі інтенсивні показники захворюваності на грип ми спостерігали в Новоград-Волинському – 3734,67 та 2829,12 на 100 тис. населення відповідно. На нашу думку, такі високі показники захворюваності на грип спричинені великою скупченістю населення, добре розвиненою транспортною магістраллю, як залізничною, так і автомобільною, що сприяла процесам міграції людей. Через ці чинники вірус грипу потрапляє з території інших районів області, областей та країн. Житомирська область межує з Рівненською, Хмельницькою, Вінницькою та Київською областями, а також з Республікою Беларусь.

Захворюваність на грип населення в Брусилівському, Лугинському та Народицькому районах має низькі інтенсивні показники, а в деяких роках, наприклад у 2002, 2006, 2007, 2009, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 рр. дорівнювала нулю (рис. 3.5, а). Інтенсивного показника захворюваності населення на ГРІ в трьох районах області, що дорівнює нулю, ні в одному році немає (рис. 3.5, б).

Такі дані можна вважати некоректними, що свідчить про проблеми діагностики або реєстрації цієї інфекції. Така думка підтверджується широким розповсюдженням на даних територіях ГРІ, які схожі за клінічними проявами з грипом (інт. показники від 3544,1 до 9005,9 на 100 тис. населення).



а)



б)

Рис.3.4 Динаміка захворюваності на грип населення міст (а) та великих за чисельністю населення районів (б) Житомирської області та в області в цілому за період з 1999 до 2015 рр.

Високі показники захворюваності на грип серед малих за чисельністю населення районів були в Народицькому районі в 2000 та 2003 рр. (4677,3 на

100 тис. населення та 4895,5 на 100 тис. населення відповідно), перевищуючи обласні показники захворюваності в 1,5 рази (рис. 3.5).

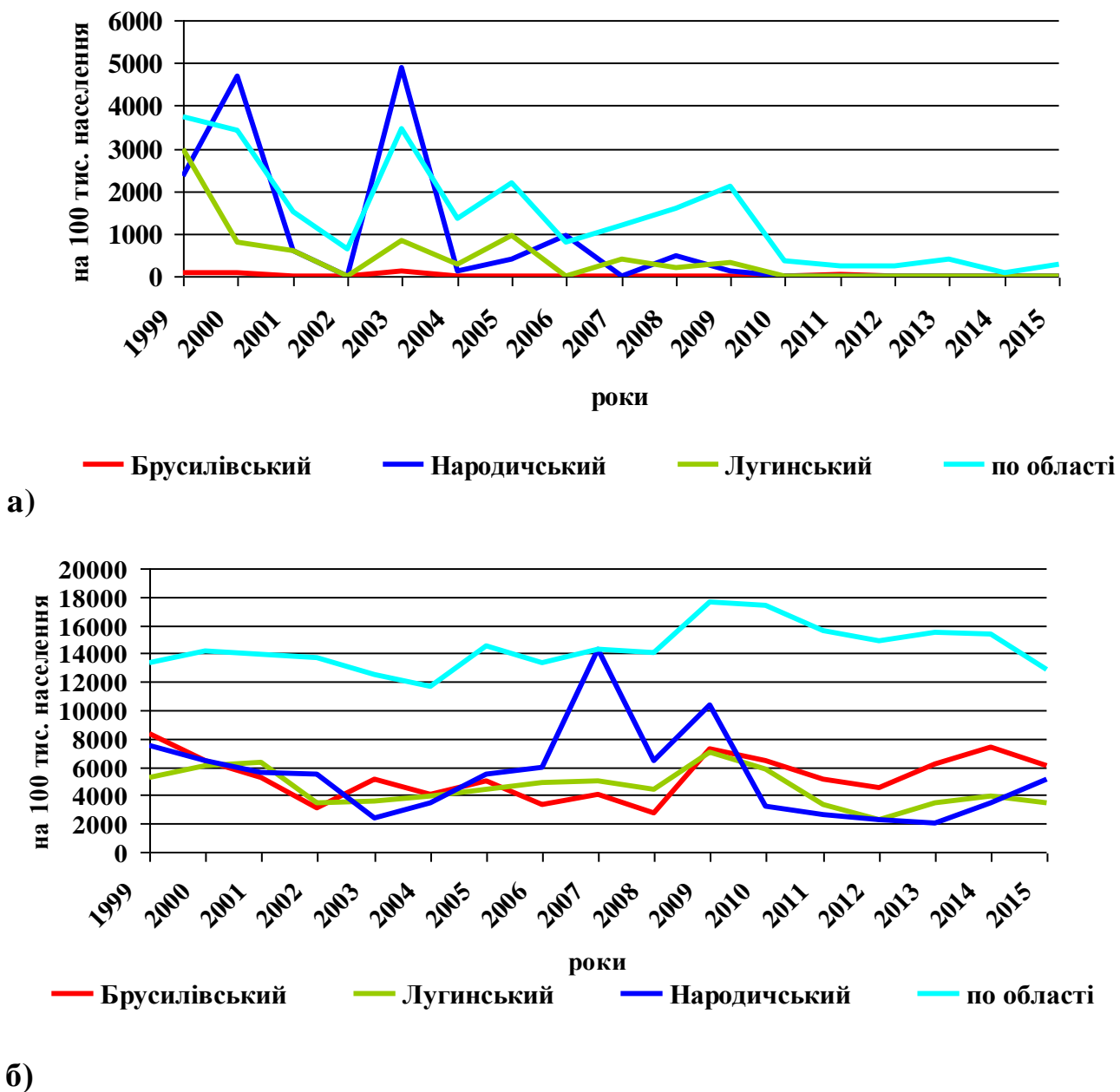


Рис.3.5 Динаміка захворюваності на грип (а) та інші ГРІ (б) населення маленьких за чисельністю населення районів Житомирської області та в області в цілому за період з 1999 до 2015 рр.

Необхідно зазначити, що найбільші показники захворюваності в цих роках також були і в Овруцькому районі. Народицький та Овруцький райони Житомирської області найбільше постраждали від аварії на Чорнобильській АЕС, що, можливо, вплинуло на сприйнятливність населення до вірусу грипу. Ці

райони межують один з одним та з Республікою Білорусь. Можливо, вірус грипу був завезений з-за кордону, а можливо, і з іншого району Житомирської та Київської областей, з якими вони межують.

Отже, було підтверджено, що захворюваність на грип найвища в тих містах та районах Житомирської області, де велика скупченість населення, інтенсивніші процеси міграції людей, наявна велика кількість промислових підприємств.

Епідеміологічні дані, що характеризують прояви епідемічного процесу грипу, дозволяють вчасно провести профілактичні та протиепідемічні заходи. Це, своєю чергою сприяє зниженню захворюваності на грип серед населення Житомирської області.

Багаторічна динаміка захворюваності на грип в окремих районах Житомирської області мала загальні закономірності, а іноді характеризувалася індивідуальними особливостями. Показники захворюваності на грип майже збігаються з перебігом захворюваності по області та України в цілому. Також виявлені закономірності в територіальному розподілі захворюваності на грип у районах, які залежать від чисельності населення, що населяють дані райони. Найбільші інтенсивні показники у великих за чисельністю населення містах та районах, а найменші у маленьких за чисельністю населення районах Житомирської області. Досліджено, що в малих за чисельністю населення районах області в деяких роках показники захворюваності на грип дорівнювали нулю. Це пов'язано з проблемами діагностики або реєстрації випадків грипу у медичних установах. Особливістю нашого спостереження є також виявлення високих показників захворюваності на грип населення в Народицькому районі Житомирської області у 2000 та 2003 рр. [134].

Показники захворюваності також залежать від збігу епідемічних штамів вірусів грипу з вакцинними. Якщо вони збігаються, вакцинація ефективна і дає змогу попередити розвиток грипу серед населення, таким чином знижуючи ці показники.

Підтверджено, що захворювання на грип за період з 1999 до 2015 рр.

зберігає свої основні характеристики епідемічного процесу, а саме: уражує всі вікові групи населення, має зимово-весняну сезонність та багаторічну циклічність.

Не дивлячись на значні досягнення в області вивчення проблем захворювання на грип, ця тема й надалі залишається актуальною. Здійснення вірусологічного моніторингу необхідне для визначення об'єму та своєчасного проведення протиепідемічних та профілактичних заходів. Визначення типу збудника в період епідемічного підйому захворюваності на грип та ГРВІ, своєчасна лабораторна діагностика має вирішальне значення для діагностики природи захворювань, призначення етіотропної терапії та проведення протиепідемічних заходів.

Стратегія боротьби із захворюванням на грип актуальна та очевидна - вакцинація як осіб з груп ризику, так і здорових дітей та підлітків. Така дія приведе до зменшення захворюваності серед різних груп населення під час епідеміологічного підйому, а також забезпечить значний економічний ефект завдяки зменшенню витрат на виплату листків працездатності та медичне обслуговування. Ще однією альтернативою може бути пошук противірусних лікарських засобів, які якомога менше будуть діяти своєю токсичністю на клітини організму, а максимально діяти на вірус грипу [2, 9, 134].

Дані описані в цьому розділі опубліковані автором в наступних друкованих працях: [2, 9, 134].

РОЗДІЛ 4 МОНІТОРИНГ ВІРУСІВ ГРИПУ ТА ІНШИХ ЗБУДНИКІВ ГРВІ, ЯКІ БУЛИ ПОШИРЕНІ В ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ ПРОТЯГОМ 2009-2015 РР.

4.1 Виявлення вірусів грипу А та В методом ПЛР у реальному часі

Наступним етапом нашого дослідження було проведення моніторингу поширення вірусів грипу та інших ГРВІ населення Житомирської області з метою попередження та зниження захворюваності на грип та інші ГРВІ серед населення.

З метою моніторингу вірусу грипу серед різних груп населення Житомирської області в період з 2009 до 2015 рр. надійшло 866 проб носоглоткових змивів, мазків із зів, носа, носоглотки від хворих із тяжким перебігом ГРВІ та секційного матеріалу від померлих осіб. Тяжкий перебіг хвороби з більшою вірогідністю несприятливого її закінчення частіше розвивався у хворих із серцево-судинною патологією, цукровим діабетом, з надлишковою (понад 20%) масою тіла та вагітних жінок. Хворі таких категорій віднесені до груп ризику щодо несприятливих наслідків захворювання на пандемічний грип.

Так, протягом даного періоду було обстежено: 215 проб за епідемічний сезон 2009-2010 рр.; 346 проб за епідемічний період 2010-2011 рр.; 72 проби за епідемічний період 2011-2012 рр.; 96 проб за епідемічний період 2012-2013 рр.; 67 проб за епідемічний період 2013-2014 рр.; 70 проб за епідемічний період 2014-2015 рр.

Епідемічний сезон 2009-2010 рр. В результаті проведення досліджень методом ПЛР у режимі реального часу (рис. 4.1 та 4.2) були отримані результати: із 215 протестованих зразків в епідемічному сезоні 2009-2010 рр. в 41 зразку визначено вірус грипу типу А (А нетипований та А(Н1N1)pdm), що становить 19,07% (90% СІ 14,61-23,52%) від загальної кількості обстежених хворих.

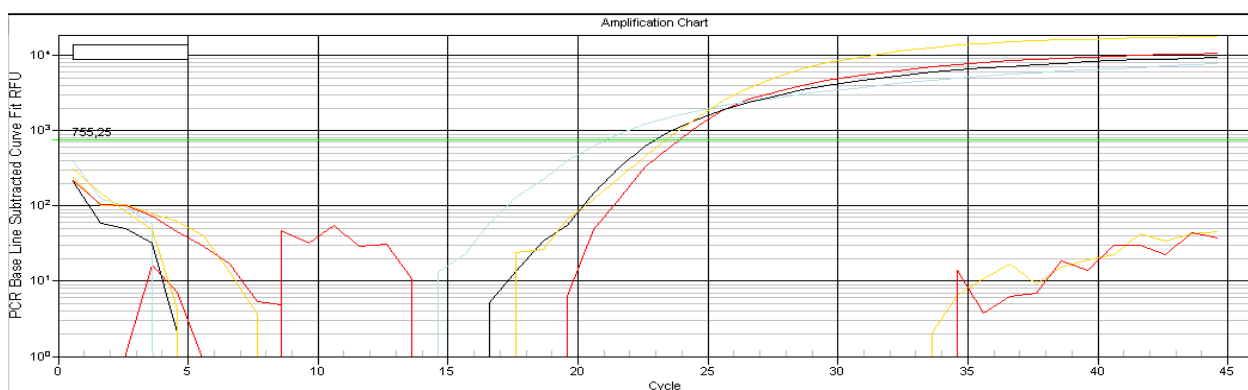


Рис. 4.1 Позитивний результат на наявність вірусу грипу A(H₁N₁)pdm (ампліфікаційні криві в логарифмічному вигляді) - позитивні реакції на маркери Univ A, swA, swH1, RP

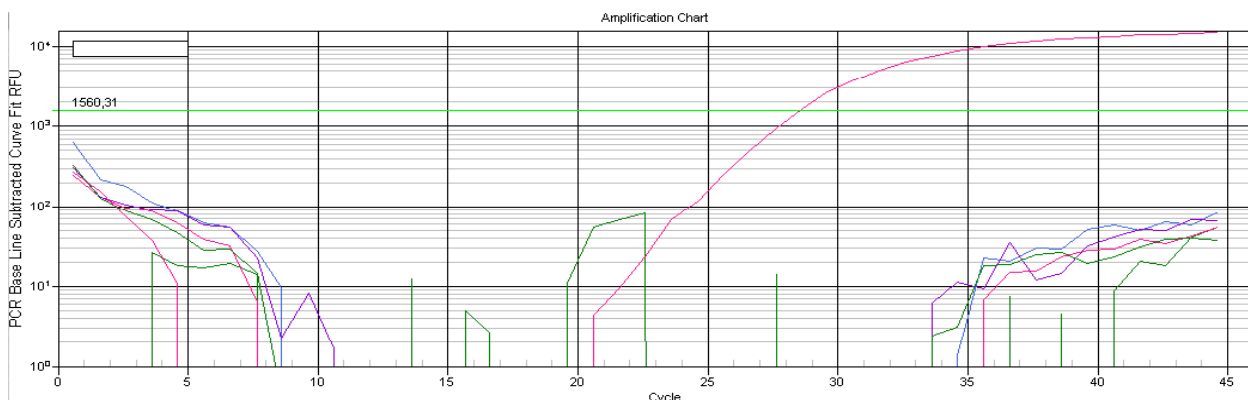


Рис. 4.2 Негативний результат (ампліфікаційна крива в логарифмічному вигляді) на наявність вірусу грипу A(H₁N₁)pdm - негативні реакції на маркери Univ A, swA, swH1 та позитивна - на RP

Максимально ураженими віковими групами в епідсезоні 2009-2010 рр. є: особи віком 21-30 р. – 17%; особи віком 31-40 р. – 34,1%; особи віком 41-50 р. – 21,9%.

Епідемічний сезон 2010-2011 рр. В результаті проведення досліджень методом ПЛР у режимі реального часу були отримані результати: з 346 досліджених зразків, у 124 зразках визначено віруси грипу типів A(A(H₁N₁)pdm) та B, які становили 29,41% (90% CI 25,41-33,41%).

Максимально ураженими віковими групами у епідсезоні 2010-2011 рр. є: особи віком 21-30 р. – 42,7%; особи віком 31-40 р. – 17%; особи віком 41-50 р. – 12% [10, 135] (рис. 4.3).

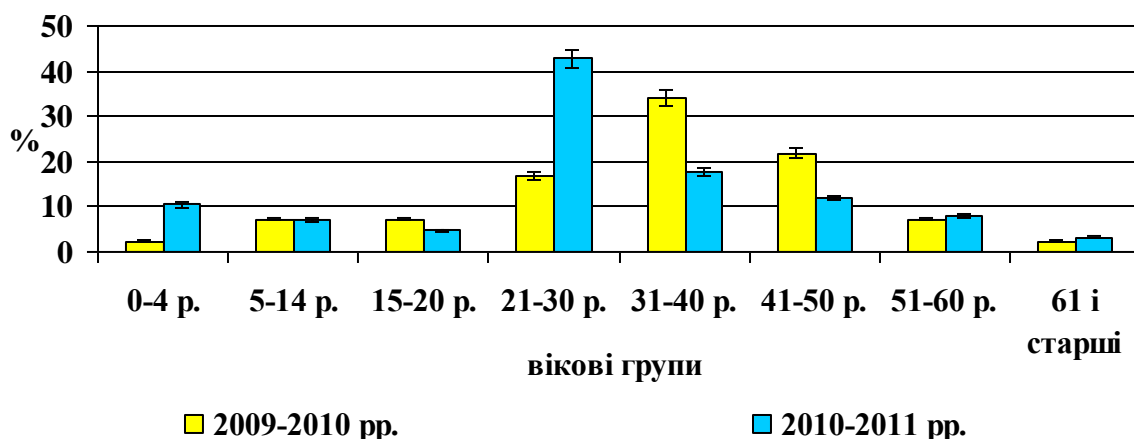


Рис. 4.3 Вікова структура хворих на ГРВІ у Житомирській області, у яких був виявлений вірус грипу за епідемічні 2009-2010 та 2010-2011 рр.

Епідемічний сезон 2011-2012 рр. В результаті проведення досліджень методом ПЛР у режимі реального часу були отримані результати: із 72 протестованих зразків в епідемічному сезоні у 25 пробах був виявлений вірус грипу А (А нетипований, А(Н3N2)) (34,7% (90% СІ 27,23-42,17%)) від загальної кількості обстежених хворих.

Максимально ураженими віковими групами в епідемічному сезоні 2011-2012 рр. були: особи віком 0-4 р. – 24%; особи віком 5-14 р. – 28%; особи віком 31-40 р. – 28% [12].

Епідемічний сезон 2012-2013 рр. В результаті проведення досліджень методом ПЛР у режимі реального часу були отримані результати: із 96 протестованих зразків в епідемічному сезоні у 24 зразках визначено віруси грипу типу А (А(Н1N1)pdm), що становило 25% (90% СІ 17,67-32,0%) від загальної кількості обстежених хворих.

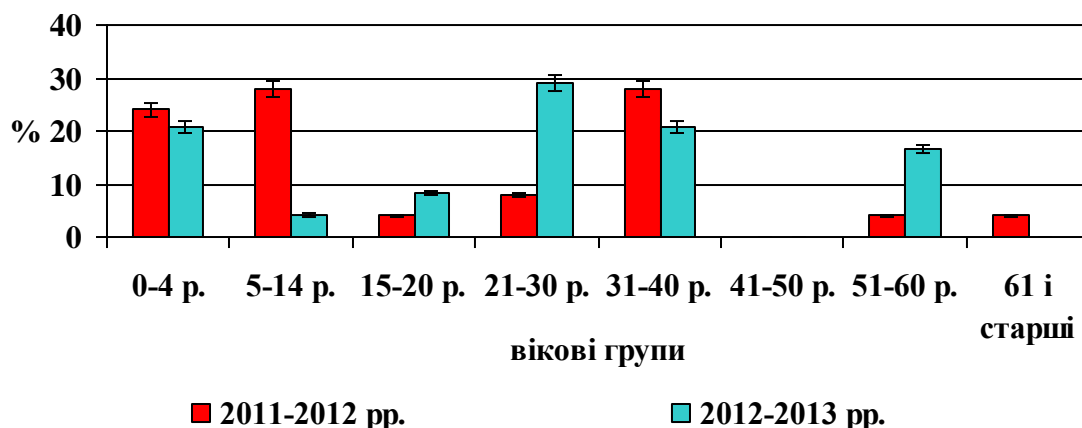


Рис. 4.4 Вікова структура хворих на ГРВІ у Житомирській області, у яких був виявлений вірус грипу за епідемічні 2011-2012 та 2012-2013 pp.

Максимально ураженими віковими групами в епідемічному сезоні 2012-2013 pp. були: особи віком 0-4 р. – 20,8%; особи віком 21-30 р. – 29,17%; особи віком 31-40 р. – 20,8%, особи віком 51-60 р. – 16,7% (рис. 4.4).

Епідемічний сезон 2013-2014 pp. В епідемічному сезоні 2013-2014 pp. було досліджено 67 зразків, із них у 18 зразках визначено віруси грипу типів А (А(Н3N2)), що становило 26,8% (90% СІ 17,8-35,7%).

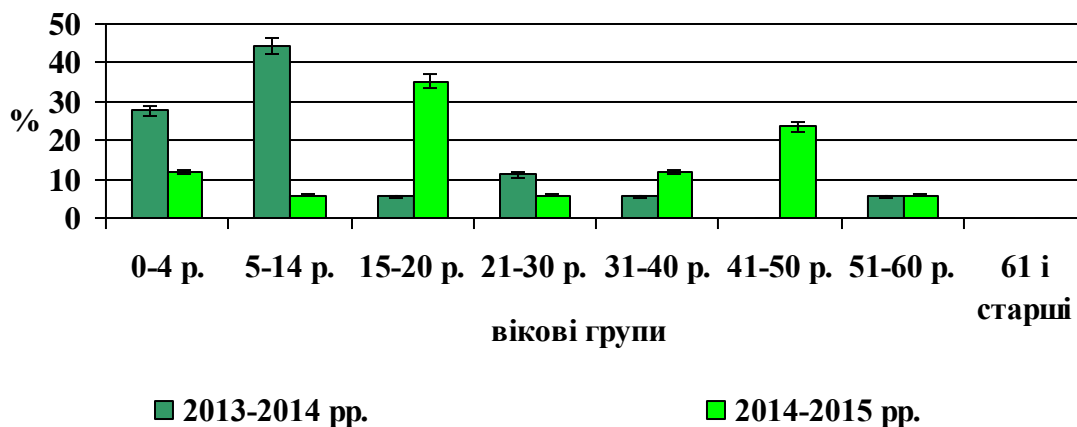


Рис. 4.5 Вікова структура хворих на ГРВІ у Житомирській області, у яких був виявлений вірус грипу за епідемічні 2013-2014 та 2014-2015 pp.

Максимально ураженими віковими групами в епідемічному сезоні 2013-2014 pp. були: особи віком 0-4 р. – 27,7%; особи віком 5-14 р. – 44,4% [1, 136].

Епідемічний сезон 2014-2015 рр. В епідемічному сезоні 2014-2015 рр. було досліджено 70 зразків, із них у 17 зразках визначено віруси грипу типів А (А нетипований, А(Н1N1)pdm, А(Н3N2)) та В, що становило 24,2% (90% СІ 15,73-32,6%) .

Максимально ураженими віковими групами в епідемічному сезоні 2013-2014 рр. були: особи віком 15-20 р – 35,3%; особи віком 41-50 р. – 23,5% (рис. 4.5).

Результати проведених досліджень свідчать про широке розповсюдження грипу серед різних груп населення Житомирської області (рис. 4.6).

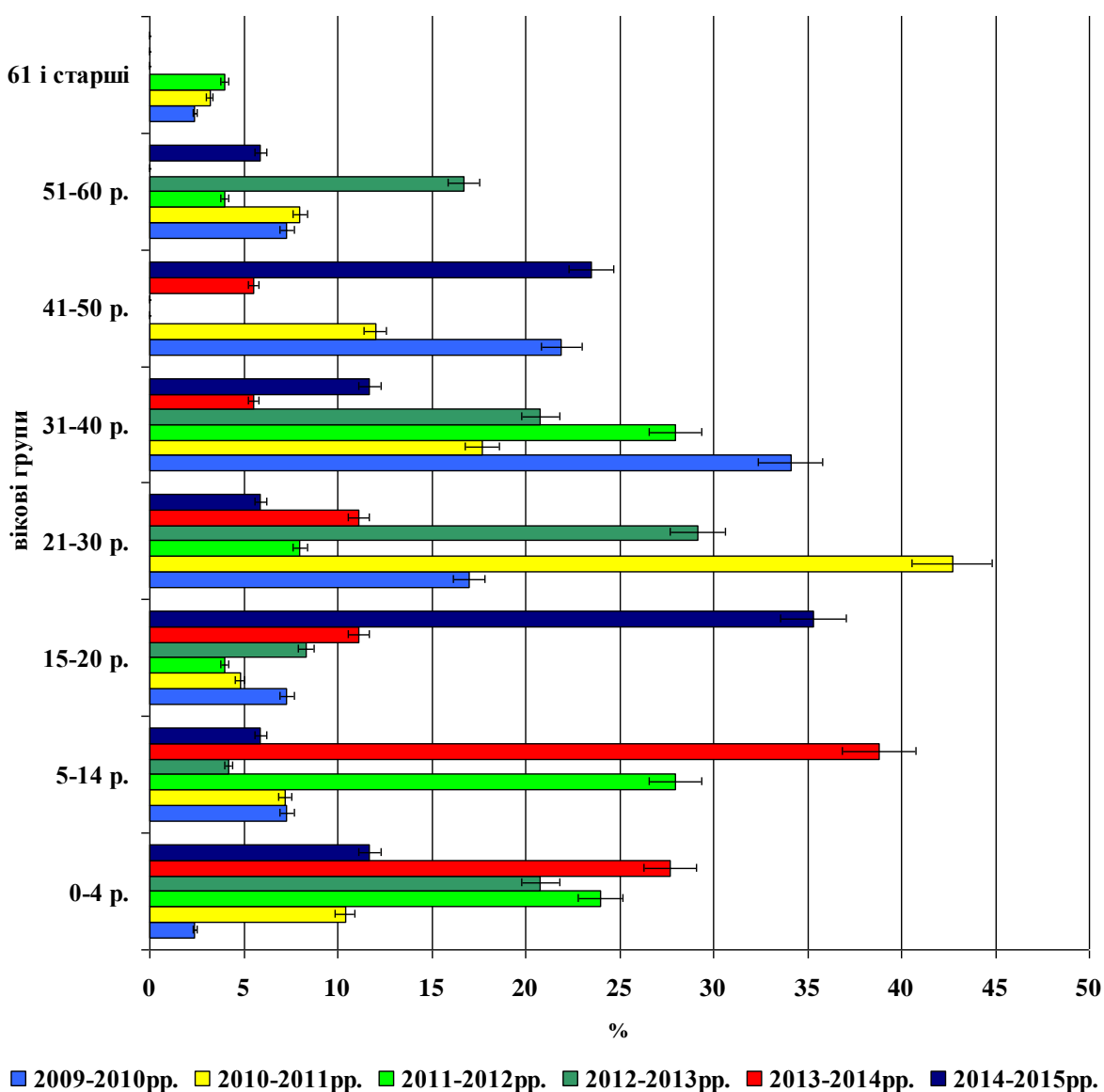


Рис. 4.6 Вікова структура хворих на ГРВІ у Житомирській області, у яких був виявлений вірус грипу протягом 2009-2015 рр.

Найбільш ураженими віковими групами протягом 2009-2015 рр. були діти віком 0-4 р. та дорослі віком 21-30 р.; 31-40 р.; 41-50 р. Причинами цього, на нашу думку, є те, що діти даної вікової групи вперше стикаються з інфекцією, вони неімунні і тому частіше хворіють. А високий відсоток виявлення вірусів грипу серед дорослого населення можна пояснити процесами міграції та більш тісними контактами між людьми. Дані є характерними для захворюваності на грип та інші ГРІ. Отримані результати збігаються з літературними даними [5].

Завдяки вчасним обмежувальним заходам (введення позачергових канікул) було уповільнено поширення вірусу грипу серед дитячого населення.

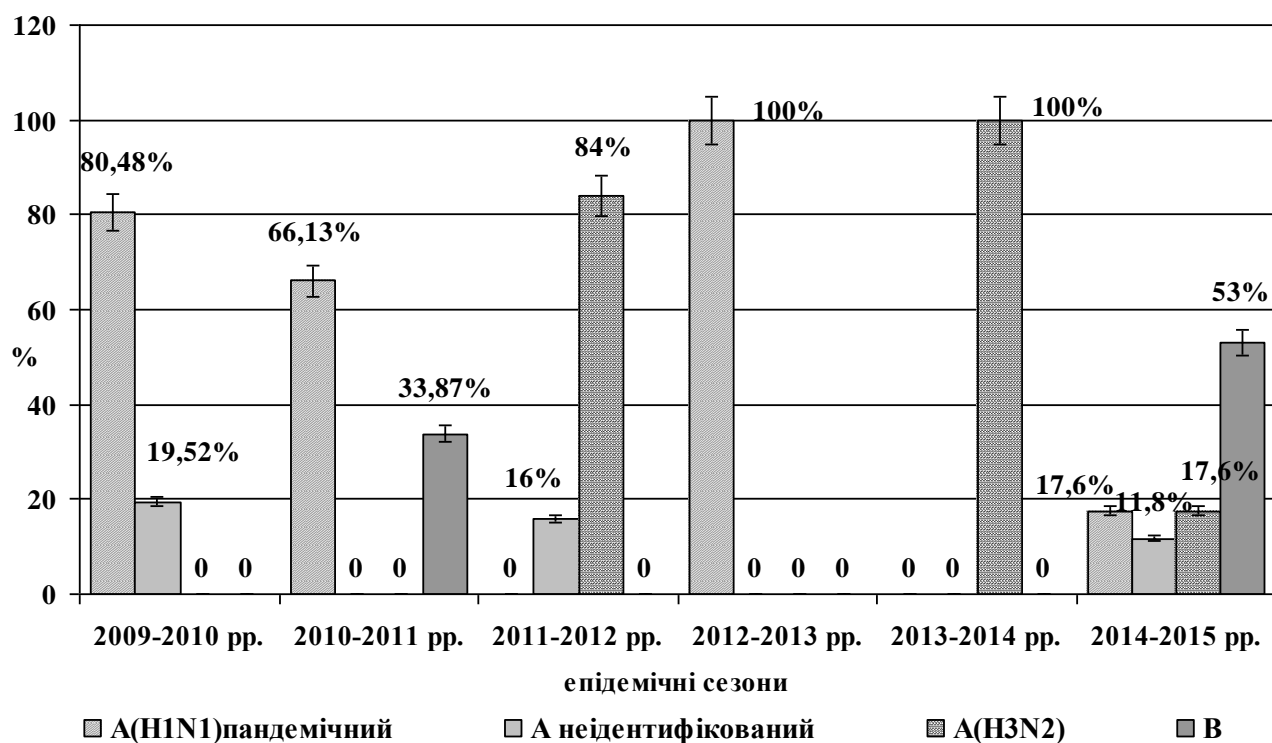


Рис. 4.7 Виявлення вірусу грипу типів А та В у хворих на ГРВІ в Житомирській області, методом ПЛР у режимі реального часу протягом 2009-2015 рр.

В заключенні можна сказати, що тільки у двох епідемічних сезонах в Житомирській області спостерігалось поширення вірусу грипу В (2010-2011 рр. та 2014-2015 рр.), у трьох епідемічних сезонах (2011-2012 рр.; 2013-2014 рр.;

2014-2015 рр.) виявлявся вірус грипу А(Н3N2), а в чотирьох епідемічних сезонах домінуючим майже на 100% був вірус грипу А(Н1N1)pdm (2009-2010 рр.; 2010-2011 рр.; 2012-2013 рр.; 2014-2015 рр.). Хоча в Україні в цілому так і в світі кожен епідемічний сезон спостерігається ко-циркуляція вірусів грипу А(Н1N1)pdm, А(Н3N2) та В (рис. 4.7).

4.2 Виявлення збудників інших ГРВІ методом ПЛР у реальному часі

У кожному епідемічному сезоні спостерігається циркуляція як вірусів грипу, так і інших респіраторних вірусів. Для того, щоб показати, що в зразках від хворих, що були негативними на віруси грипу А та В, можуть бути інші респіраторні віруси, ми провели диференційну діагностику грипу та інших ГРВІ.

Детекцію на наявність інших вірусів, що викликають ГРВІ, проводили методом ПЛР у реальному часі. Для цього використали набір реагентів «ОРВІ скрин» (Амплісенс, Россия) для виявлення РНК респіраторно-синцитіального вірусу (*human Respiratory Syncytial virus - hRSv*), метапневмовірусу (*human Metapneumovirus - hMpv*), вірусів парагрипу 1, 2, 3 та 4 типів (*human Parainfluenza virus-1-4 - hPiv*), коронавірусів видів OC43, E229, NL63, НКUI (*human Coronavirus - hCov*), риновірусів (*human Rhinovirus - hRv*), ДНК аденовірусів груп В, С і Е (*human Adenovirus - hAdv*) та бокавірусу (*human Bocavirus - hBov*).

Для зручності проведення моніторингу етіології ГРВІ всі обстежені особи були розділені на п'ять вікових груп: 0-1 р.; 2-4 р.; 5-14 р.; 15-29 р.; 30-64 р. та склали 50 осіб, відібраних за клінічними проявами та тяжкістю перебігу ГРВІ.

Як видно з рис. 4.8, в епідемічному сезоні 2012-2013 рр. найбільш ураженими віковими групами були особи віком 0-1 р. – 8%; 2-4 р. – 12% та 30-64 р. – 8%. В епідемічному сезоні 2013-2014 рр. були особи віком 2-4 р. – 8%; 15-29 р. – 16%.

Особливістю нашого спостереження є те, що протягом двох сезонів найбільш ураженою збудниками ГРВІ групою були особи віком 2-4 р.

На нашу думку, такі результати говорять про те, що більша увага приділяється маленьким дітям, звідси більша кількість звернень в заклади охорони здоров'я та, як наслідок, високий відсоток виявлених збудників ГРВІ.

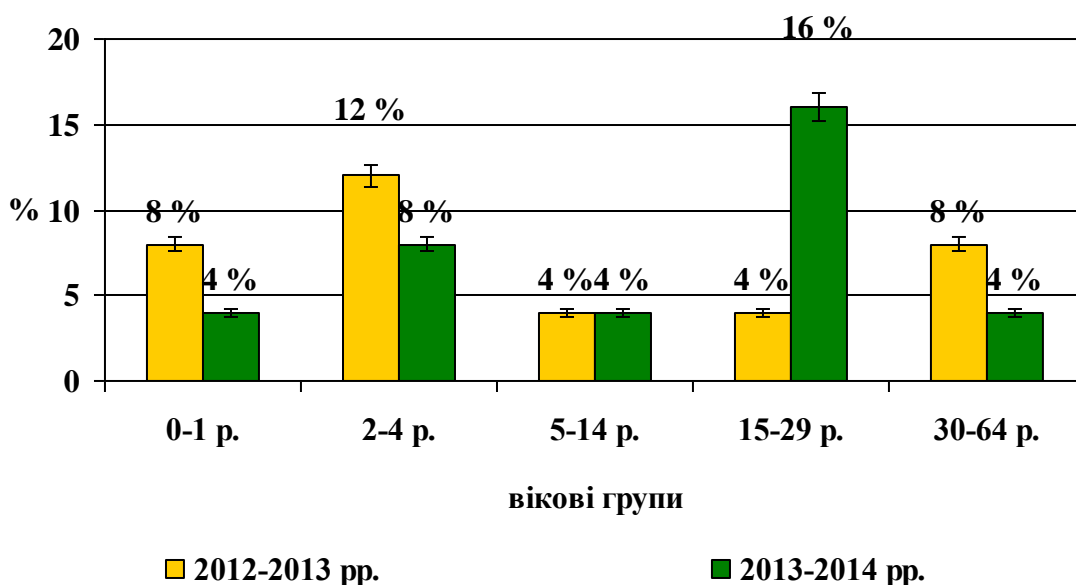


Рис. 4.8 Вікова структура обстежених осіб у Житомирській області, у яких методом ПЛР у реальному часі виявлено інші респіраторні віруси

Етіологічна структура виявлених ГРВІ була така: в епідемічному сезоні 2012-2013 рр. з 25 протестованих зразків у 9 було визначено фрагменти НК вірусів ГРВІ (рис. 4.9): МрV – 8% (n=2), АдV – 8% (n=2), СоV (НКU1/OC43) – 8% (n=2), RhV – 4% (n=1), СоV (NL63/229E) – 4% (n=1), СоV (НКU1/OC43) + RhV – 4% (n=1).

А в епідемічному сезоні 2013-2014 рр. з 25 протестованих зразків у 9 було визначено фрагменти НК вірусів ГРВІ: МрV – 8% (n=2), АдV – 20% (n=4), СоV (НКU1/OC43) – 4% (n=1), СоV (NL63/229E) – 4% (n=1), АдV + RhV – 4% (n=1).

У двох випадках була зафіксована мікст-інфекція (в епідемічному сезоні 2012-2013 рр. – СоV (НКU1/OC43) + RhV, а в епідемічному сезоні

2013-2014 рр. – AdV + RhV). Проби були відібрані від дорослих осіб з попередніми клінічними діагнозами: грип, пневмонія та ГРВІ з важким перебігом.

В епідемічному сезоні 2012-2013 рр. в одній пробі був виявлений риновірус. Цей зразок був відібраний від немовляти з попереднім клінічним діагнозом – двобічна вогнищева пневмонія важкого перебігу. А в епідемічному сезоні 2013-2014 рр. вже не виявлявся RhV (рис. 4.9).

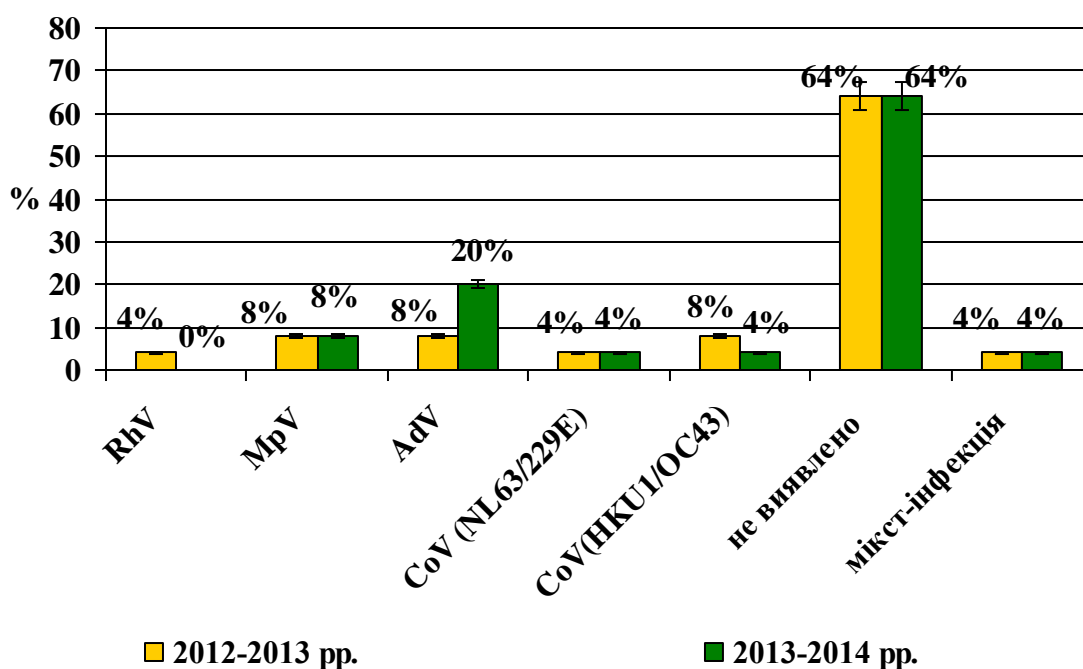


Рис. 4.9 Результати проведених досліджень на виявлення інших ГРВІ серед населення Житомирської області

В епідемічному сезоні 2013-2014 рр. питома вага виявлених в клінічному матеріалі аденовірусів збільшилась (8-20%). Дані зразки були відібрані у дорослих осіб (осіб віком 15-29 р.). За літературними джерелами аденовіруси можуть виділятися від хворого довготривалий час – майже 14 днів, деколи більше. На нашу думку, така кількість виявлених аденовірусів порівняно з іншими вірусними агентами (респіраторно-синцитіальний вірус та вірус парагрипу) може бути пов'язана як з особливостями перебігу хвороби, так

і невчасним зверненням хворих до медичних установ, самолікуванням, що властиво даній групі. Респіраторно-синцитіальний вірус та віруси парагрипу не були виявлені, тому що вони є в клінічному матеріалі тільки в перші 5 днів захворювання. А дослідження ми проводили безпосередньо під час циркуляції вірусів грипу серед населення Житомирської області, а респіраторно-синцитіальний вірус та віруси парагрипу передують вірусам грипу, що підтверджується літературними даними.

З 50 протестованих зразків в обох сезонах позитивними на наявність вірусів ГРВІ було 18 проб (36%) (90% СІ 26,34 - 45,5%) (рис. 4.10).

За наявністю в пробах мають перевагу аденовіруси – 35%, коронавіруси CoV (HKU1/OC43) – 20% та МрV – 20% від загальної кількості позитивних. Менше зустрічались риновіруси (15%) та коронавіруси CoV (NL63/229E) (10%).

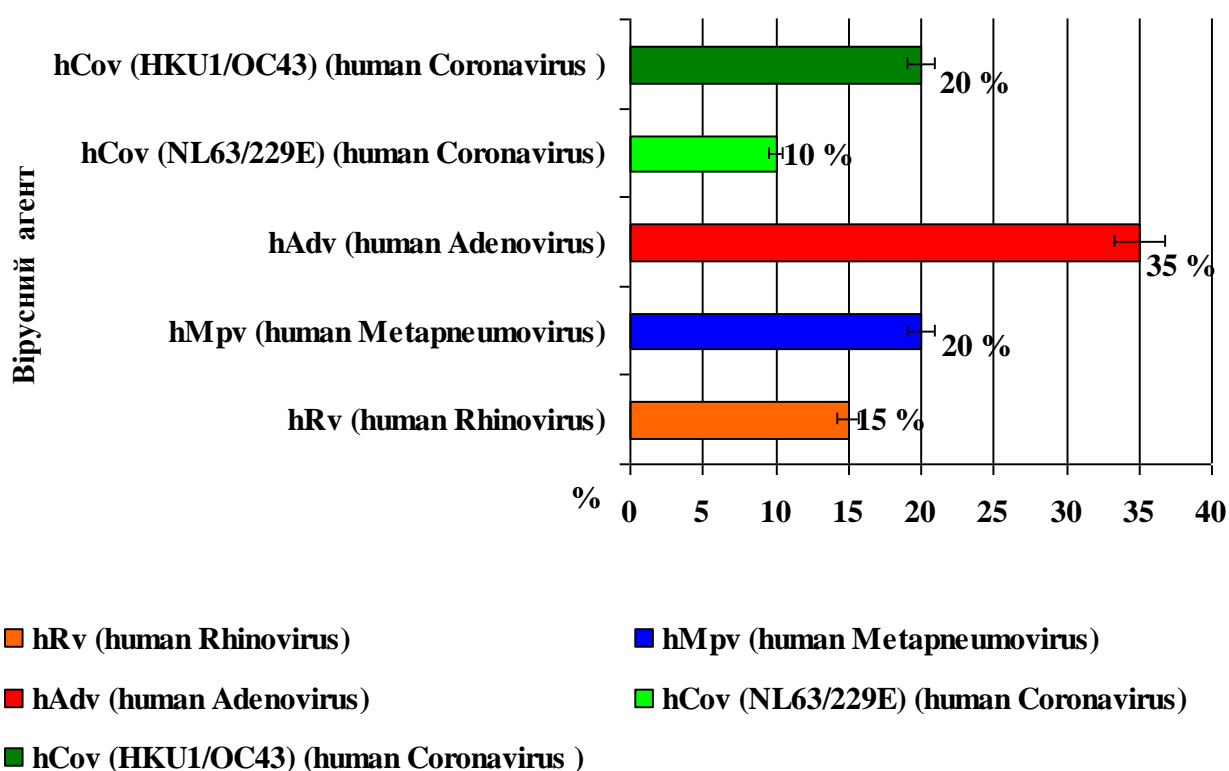


Рис. 4.10 Розподіл вірусних агентів, виявлених серед населення Житомирської області за епідемічні 2012-2013 та 2013-2014 рр.

Усі ГРВІ мають схожі клінічні ознаки, тому проведені дослідження показали доцільність її використання. Можна стверджувати, що під час епідемії грипу в Житомирській області крім вірусів грипу циркулюють також аденовіруси, коронавіруси двох груп (HKU1/OC43 та NL63/229E), метапневмовіруси (MpV) та риновіруси (RhV). Крім моноінфекції ми спостерігали наявність мікст-інфекції (в епідемічному сезоні 2012-2013рр. – CoV (HKU1/OC43) + RhV, а в епідемічному сезоні 2013-2014 рр. – AdV + RhV). Результати, які були отримані, збігаються з літературними даними.

Отримані результати дають більш широке розуміння про поширення ГРВІ, що є поштовхом для розробки та застосування протиепідемічних та профілактичних заходів для попередження зростання захворюваності на грип та інші ГРВІ. Для одержання повної картини щодо етіології ГРВІ необхідно постійно проводити паралельно як епідеміологічний, так і вірусологічний моніторинг за ними.

При проведенні наших досліджень було виявлено 64% негативних зразків як на грип, так і на інші 9 респіраторних патогенів. Ми вважаємо, що високий відсоток виявлених негативних зразків може бути внаслідок того, що всі відомі тест-системи визначають найбільш поширені збудники ГРВІ, хоча існує більше 200 вірусів, які здатні викликати ураження респіраторного тракту. Не всі віруси досконало вивчені, тому інші респіраторні віруси залишаються недіагностованими [1, 136].

Дані описані в цьому розділі опубліковані автором в наступних друкованих працях: [1, 10, 12, 135, 136].

РОЗДІЛ 5 ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ, ВИДЛЕНИХ У ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ ЗА ПЕРІОД З 2009 ДО 2015 РР.

5.1 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу А(Н1N1)pdm, які циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.

Отже, виявлені нами віруси грипу в період з 2009 до 2015 рр. ізолювали на культурі клітин MDCK та MDCK-SIAT для подальшого проведення сиквенування та філогенетичного аналізу послідовностей генів вірусів грипу А(Н1N1)pdm, А(Н3N2) та В з метою виявлення амінокислотних заміщень. Генетична та антигенна характеристика циркулюючих у популяції людей вірусів грипу необхідна для прогнозування в майбутньому епідемій і пандемій та проведення профілактичних і протиепідемічних заходів, серед яких основне місце займає вакцинація (оновлення складу вакцини проти грипу для майбутніх сезонів).

При проведенні філогенетичного аналізу виявлених у Житомирській області вірусів грипу були виявлені деякі особливості.

Вірус грипу А(Н1N1)pdm виявлявся серед населення Житомирської області в чотирьох епідемічних сезонах: 2009-2010 рр., 2010-2011 рр., 2012-2013 рр. та 2014-2015 рр. У перших трьох сезонах він залишався домінуючим, а в останньому епідемічному сезоні спостерігалася ко-циркуляція поряд з вірусами грипу А(Н3N2) і В, але домінуючим був вже вірус грипу В. Особливістю епідемічного сезону 2010-2011 рр. було те, що ми на початку сезону виявлявся лише вірус грипу В, а потім тільки вірус грипу А(Н1N1)pdm. В результаті виявлявся в більшій кількості клінічного матеріалу. Такі результати не збігаються з літературними даними.

Усі досліджувані ізоляти в амінокислотних послідовностях гемаглютиніну набули заміщення Р83S, І321V крім вакцинного штаму А/California/07/2009, а також S203T – ще й крім А/Bayern/69/2009, А/England/195/2009, А/Auckland/3/2009. Усі досліджувані ізоляти в

амінокислотних послідовностях нейрамінідази селектували заміщення N248D, крім вакцинного штаму A/California/07/2009 та референс-штамів A/Bayern/69/2009, A/England/195/2009, A/Auckland/3/2009. Також є заміщення, які властиві тільки для даного епідемічного сезону, які будуть викладені нижче (рис. 5.1, 5.2).

Епідемічний сезон 2009-2010 рр. Даний сезон був особливий тим, що в ньому почав поширюватися новий за антигенними властивостями вірус грипу A(H1N1)pdm. Внаслідок чого відбулась перша пандемія в цьому столітті.

Для філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності, що кодують HA та NA вакцинного штаму – A/California/07/2009pdm та референс-штамів: A/Bayern/69/2009, A/England/195/2009, A/Bayern/69/2009, A/Auckland/3/2009, A/Lviv/N6/2009; досліджуваних ізолятів: A/Ukraine-Zh/220/2009, A/Ukraine-Zh/199/2010, A/Ukraine-Zh/123/2010, A/Ukraine-Zh/203/2009, A/Ukraine-Zh/132/2010.

Досліджувані ізоляти виявились подібними до вакцинного штаму A/California/07/2009pdm. Ізоляти A/Ukraine-Zh/199/2010 та A/Ukraine-Zh/123/2010 набули амінокислотне заміщення M227I, але у них не було заміщення I321V. Всі досліджувані ізоляти були більш подібними до референс-штаму A/Lviv/N6/2009, але не мали заміщення D222G та ввійшли в першу субгрупу клайду A/California/07/2009pdm (рис. 5.1).

Проведений філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей NA показав, що їх мінливість знаходиться на тому самому рівні, що і в нуклеотидних послідовностях HA. Особливістю даного сезону є те, що ізоляти даного сезону набули заміщення V106I в нуклеотидних послідовностях NA, яке у вірусів попередніх епідемічних сезонів не виявлялось (рис. 5.2).

Епідемічний сезон 2010-2011 рр. Даний сезон був постпандемічним. Для філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності, що кодують HA та NA вакцинного штаму – A/California/07/2009pdm; референс-штамів: A/Hong Kong/3934/2011, A/Christchurch/16/2010, A/Astrakhan/1/2011,

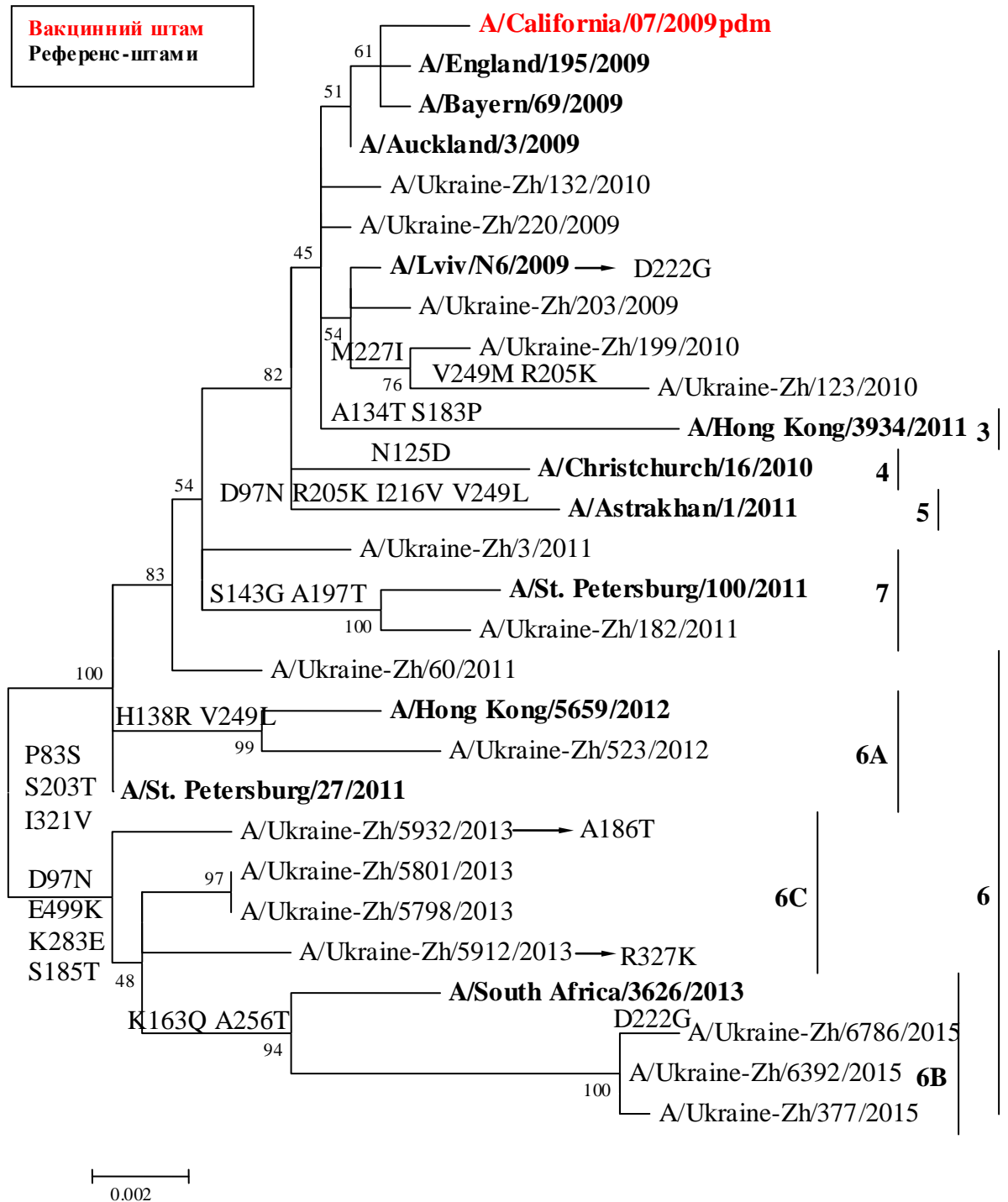


Рис. 5.1 Філогенетичний аналіз вірусів грипу A(H1N1)pdm за нуклеотидними послідовностями НА, що циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.

A/St.Petersburg/100/2011, A/St.Petersburg/27/2011; досліджуваних ізолятів: A/Ukraine-Zh/182/2011, A/Ukraine-Zh/3/2011, A/Ukraine-Zh /60/2011.

Досліджувані віруси мали заміщення S185T (A), S451N. Ізолят A/Ukraine-Zh/182/2011 разом із референс-штамом A/St.Petersburg/100/2011 показали заміщення S143G та A197T. А ізолят A/Ukraine-Zh/60/2011 набув заміщення D97N та A186T. Ізоляти A/Ukraine-Zh/3/2011, A/Ukraine-Zh/60/2011 увійшли в шосту субгрупу, а ізолят A/Ukraine-Zh/182/2011 увійшов в сьому субгрупу та був подібний до референс-штаму A/St.Petersburg/100/2011.

Досліджувані ізоляти епідемічних сезонів 2012-2013 рр. та 2014-2015 рр. мали як спільні, так і групові заміщення в нуклеотидних послідовностях НА. Ізоляти двох епідемічних сезонів набули спільні заміщення в послідовностях генів НА D97N, K283E, S185T, E499K.

У нуклеотидних послідовностях НА досліджуваних вірусів спостерігалось заміщення V106I (рис. 5.2).

Епідемічний сезон 2012-2013 рр. Для філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності, що кодують НА та НА вакцинного штаму – A/California/07/2009pdm; референс-штаму: A/Hong Kong/5659/2012; досліджуваних ізолятів: A/Ukraine-Zh/5912/2013, A/Ukraine-Zh/5801/2013, A/Ukraine-Zh/5932/2013, A/Ukraine-Zh/5798/2013, A/Ukraine-Zh/523/2012. Ізоляти цього сезону набули спільне заміщення V234I, а ізолят A/Ukraine-Zh/523/2012 його не має. Ізолят A/Ukraine-Zh/5932/2013 набув заміщення A186T, D274N, а ізолят A/Ukraine-Zh/5912/2013 селектував заміщення R327K. Дані віруси грипу увійшли в субгрупу 6C, а ізолят A/Ukraine-Zh/523/2012, подібний до референс-штаму A/Hong Kong/5659/2012, увійшов в генетичну групу 6A.

Результати філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей НА показали, що віруси грипу даного сезону повернули заміщення I106V, таке як у є A/California/07/2009, A/Bayern/69/2009, A/England/195/2009.

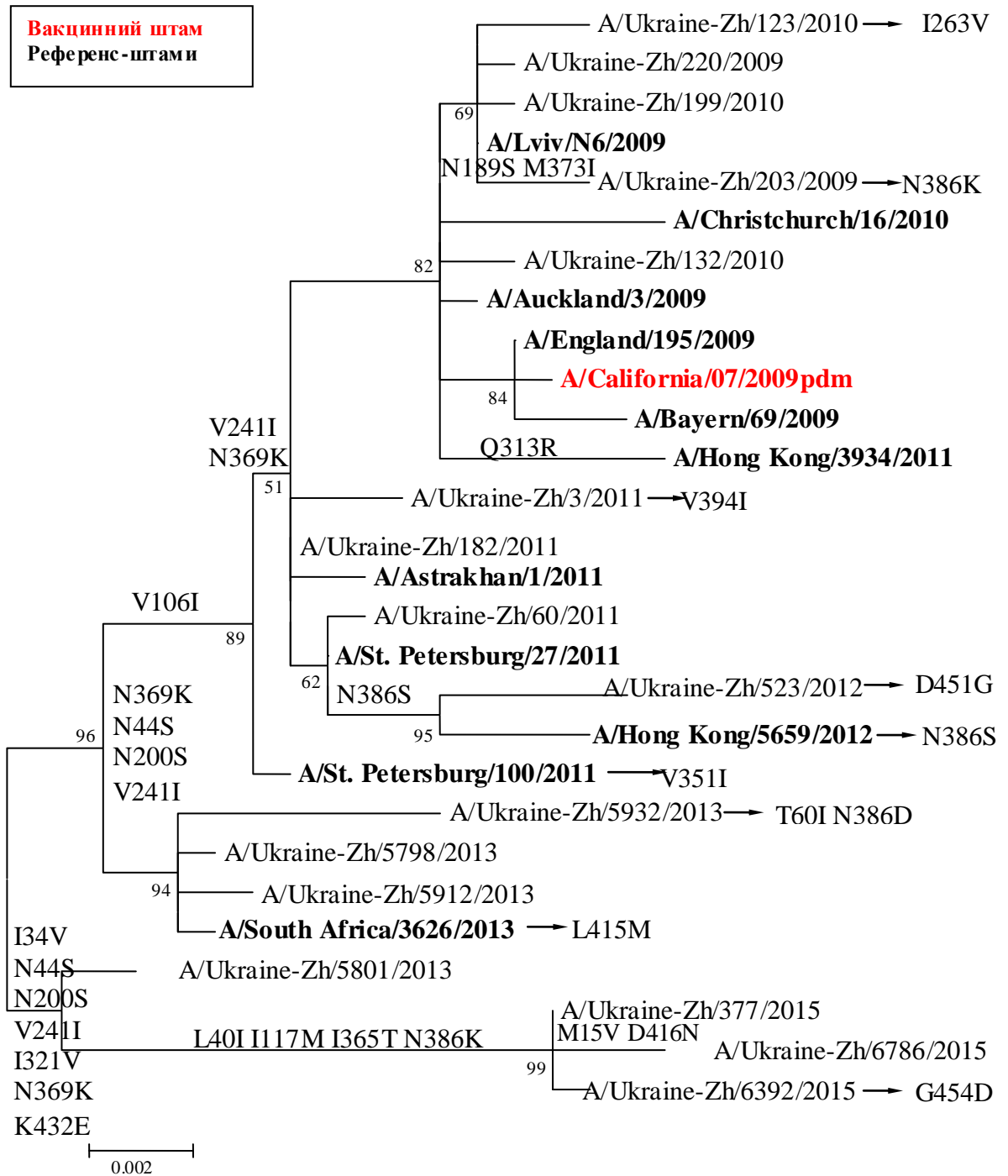


Рис. 5.2 Філогенетичний аналіз вірусів грипу A(H1N1)pdm за нуклеотидними послідовностями NA, що циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.

Отже, в даному випадку відбулася реверсія. Також всі досліджувані ізоляти даного сезону набули заміщення V241I, N369K, N44S, N200S, які не спостерігались у досліджуваних ізолятах попередніх епідемічних сезонів. Але ізолят A/Ukraine-Zh/523/2012 селектував заміщення V106I, як у вірусах попередніх сезонів 2009-2010 та 2010-2011 рр. (рис. 5.2).

Епідемічний сезон 2014-2015 рр. Для філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності, що кодують HA та NA вакцинного штаму – A/California/07/2009pdm; референс-штаму: A/South Africa/3626/2013; досліджуваних ізолятів: A/Ukraine-Zh/6786/2015, A/Ukraine-Zh/6392/2015, A/Ukraine-Zh/377/2015.

Досліджувані віруси набули заміщення K163Q, A256T та були подібними до референс-штаму A/South Africa/3626/2013. Ізолят A/Ukraine-Zh/6786/2015 набув заміщення D222G, яке також спостерігалось у референс-штаму A/Lviv/N6/2009. В результаті такого заміщення хвороба має важкий перебіг. Дані віруси грипу увійшли в субгрупу 6B (рис. 5.1).

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей NA досліджуваних ізолятів та референс-штаму A/South Africa/3626/2013 показав, що крім отриманих заміщень в епідемічному сезоні 2012-2013рр., набули нові: I34V, I321K, K432E. Наші ізоляти ще й селектували заміщення L40I, I117M, I365T, N386K. Ізолят A/Ukraine-Zh/6786/2015 також набув заміщення M15V, D416N, а ізолят A/Ukraine-Zh/6392/2015 селектував G454D (рис. 5.2).

Таким чином, всі досліджувані житомирські ізоляти за послідовностями HA та NA відносять до генетичного кладу A/California/07/2009pdm. Проте штами чотирьох епідемічних сезонів у процесі еволюції увійшли до різних субгруп даного кладу:

- ізоляти епідемічного сезону 2009-2010 рр. увійшли до першої генетичної субгрупи;
- штами епідемічного сезону 2010-2011 рр. увійшли до шостої та сьомої генетичної субгрупи;

- ізоляти епідемічного сезону 2012-2013 рр. увійшли до генетичних підгруп А та С шостої субгрупи;
- штами епідемічного сезону 2014-2015 рр. увійшли до генетичної підгрупи В шостої субгрупи.

Також можна зазначити, що мінливість вірусів грипу А(Н1N1)pdm, пов'язана з мутаціями в генах поверхневих антигенів НА та NA вірусів, знаходиться на низькому рівні, що говорить про малу ймовірність появи нових варіантів вірусу, який за антигенними властивостями дуже відрізнявся б від вакцинного штаму. Тому, на епідемічний сезон 2015-2016 рр. рекомендовано включати у склад протигрипозної вакцини А/California/07/2009pdm.

5.2 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу А(Н3N2), які циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.

Вірус грипу А(Н3N2) виявлявся серед населення Житомирської області в трьох епідемічних сезонах: 2011-2012 рр., 2013-2014 рр. та 2014-2015 рр. Якщо в перших двох сезонах ми спостерігали моноциркуляцію, то в останньому коциркуляцію вірусів грипу з вірусом грипу А(Н1N1)pdm та вірусом грипу В, який був домінуючим.

Епідемічний сезон 2011-2012 рр. Для проведення філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності генів НА та NA вірусів грипу А(Н3N2) даного сезону, вакцинного штаму – А/Perth/16/2009 та референс-штамів: А/Brisbane/10/2007, А/Victoria/208/2009, А/Hong Kong/3969/2011, А/Stockholm/18/2011, А/Iowa/19/2010. Досліджувані ізоляти: А/Ukraine-Zh/5329/2012, А/Ukraine-Zh/5500/2012, А/Ukraine-Zh/5426/2012, А/Ukraine-Zh/5333/2012, А/Ukraine-Zh /5378/2012 (рис. 5.3, 5.4).

За результатами філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей генів НА було побудовано дендрограму. Як показано на рис. 5.3 ізоляти епідемічного сезону 2011-2012 рр. розташувались в шостій генетичній групі

генетичного класу A/Victoria/208 завдяки селектуванню заміщень K62E, K144N (отримання додаткового сайту глікозилування), S214I та T212A відносно

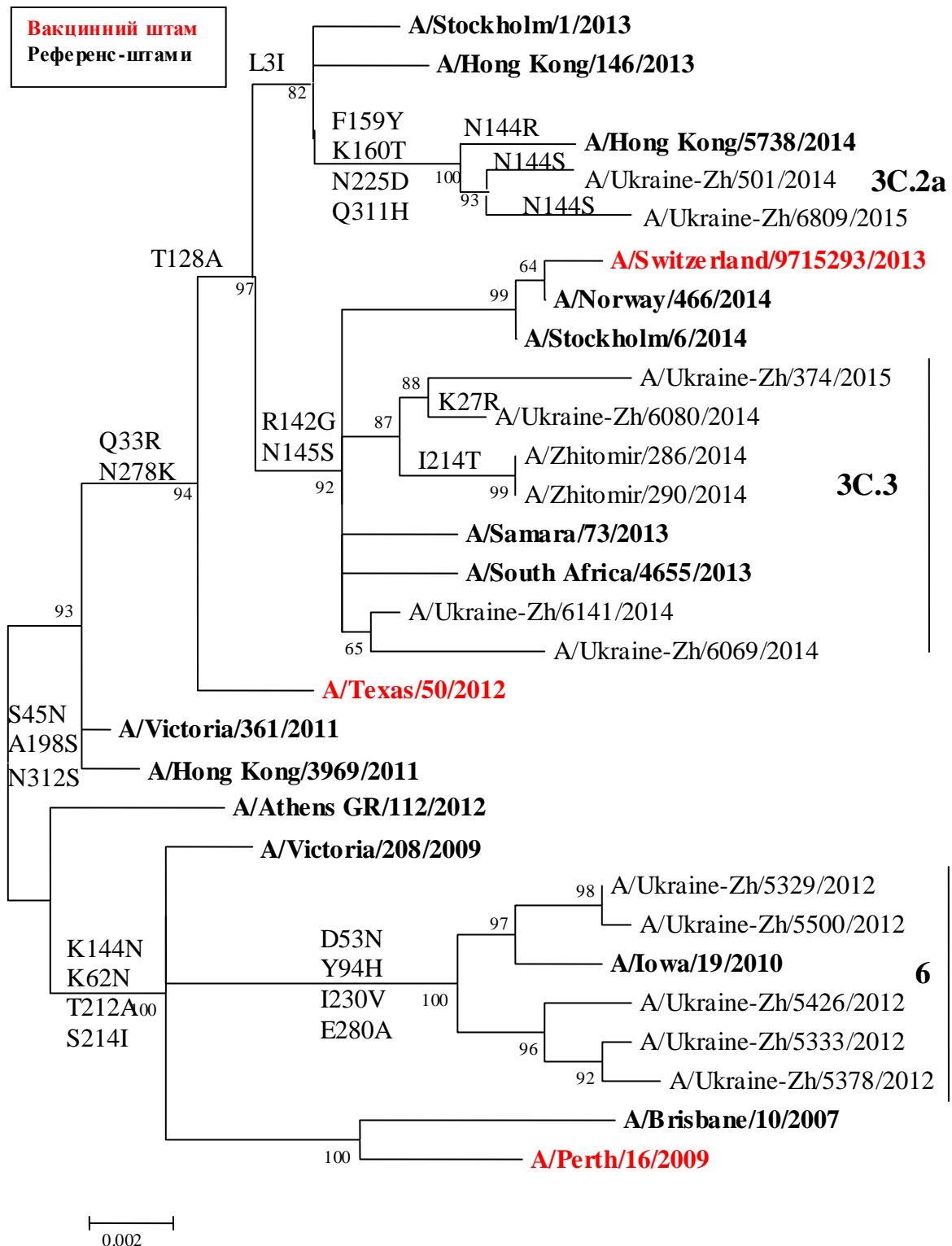


Рис. 5.3 Філогенетичний аналіз вірусів грипу А (H3N2) за нуклеотидними послідовностями HA, що циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.

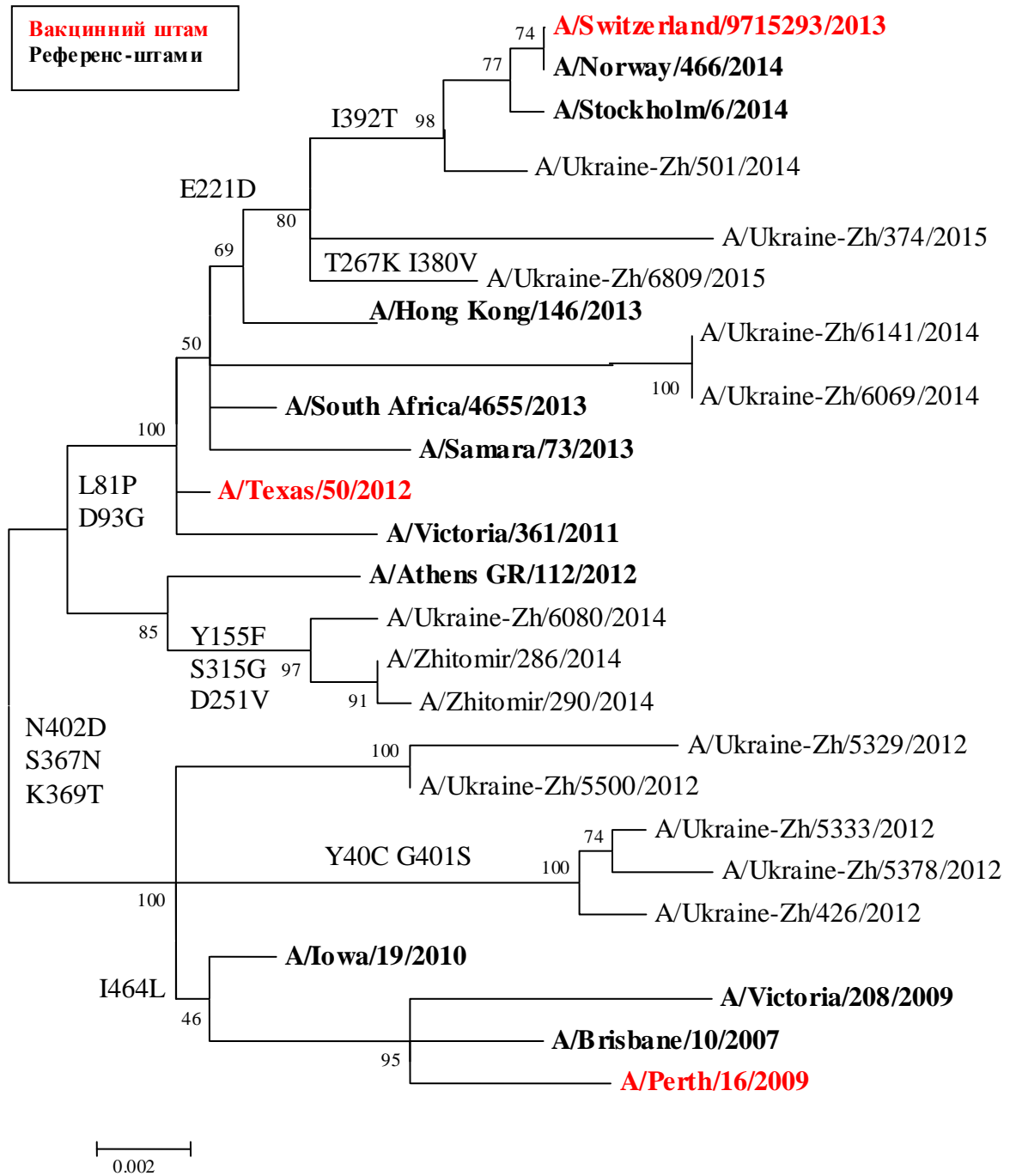


Рис. 5.4 Філогенетичний аналіз вірусів грипу А (H3N2) за нуклеотидними послідовностями NA, що циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.

вірусів, що відносять до кладу Perth/16. Наші ізоляти набули заміщення D53N, Y94H, I230V та E280A, вони є більш подібні до референс-штаму A/Iowa/19/2010, ніж до інших референс-вірусів, що використовувались в цьому сезоні.

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів NA вірусів грипу показав, що житомирські ізоляти селектували заміщення S367N, K369T, N402D, що призводить до отримання додаткового сайту глікозилування в залишку 367 (рис. 5.4).

Епідемічний сезон 2013-2014 рр. Для проведення філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності генів HA та NA вірусів грипу A(H3N2) даного сезону, вакцинного штаму – A/Texas/50/2012 та референс-штамів: A/Victoria/361/2011, A/Hong Kong/146/2013, A/Stockholm/1/2013, A/Serbia/NS-210/2013, A/South Africa/4655/2013, A/Samara/73/2013, A/Almaty/2958/2013. Досліджувані ізоляти: A/Ukraine-Zh/6141/2014, A/Ukraine-Zh/6080/2014, A/Zhitomir/286/2014, A/Zhitomir/290/2014, A/Ukraine-Zh/6069/2014.

Досліджувані ізоляти епідемічного сезону 2013-2014 рр. відносять до третьої підгрупи субкластеру 3С кластеру A/Victoria/ 208/2009. Вони є подібними до референс-штаму A/Samara/73/2013, тому що набули заміщення T128A (втрата сайту глікозилування), R142G, N145S.

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів нейрамінідази показав, що житомирські ізоляти набули заміщення Y155F та D251V. Мутації L81P і N402D (втрата сайту глікозилування) характерні для субкластеру 3С. Дана група є подібною до A/Athens GR/112/2012 ніж до нових референс-вірусів.

В епідемічному сезоні 2013-2014 рр. ми зробили філогенетичний аналіз послідовностей генів HA та NA методом правдоподібності, використовуючи не тільки вакцинний та референс-штами, а також ізоляти з усього світу, виділених в даному сезоні (рис. 5.5 та 5.6). Всі досліджувані ізоляти в процесі еволюції в послідовностях гену HA набули нові спільні (Q33R), групові (L157S, I214T, N122D) та індивідуальні (V402I) амінокислотні заміщення відносно вакцинного та референс-штамів. Отже, залежно від таких змін ми змогли поділити досліджувані ізоляти на дві групи (рис. 5.6).

До першої групи ввійшли ізоляти, які селектували амінокислотні заміщення N145S (аспарагін замістився на серін) та D489N (аспарагінова

кислота замістилась на аспарагін). Група складається з українських ізолятів, світових штамів та референс-штамів A/Hong Kong/146/2013 та A/Stockholm/1/2013. Референс-штам A/Stockholm/1/2013 набув I242V та P289S, а у A/Hong Kong/146/2013 з'явився новий сайт глікозилювання S312N.

До другої групи серед ізолятів з усього світу увійшла велика кількість українських вірусів, серед них житомирські та референс-штами, які селектували заміщення T128A (втрата потенційного сайту глікозилювання) та R142G. До групи також увійшли референс-штами: A/Serbia/NS-210/2013, A/South Africa/4655/2013, A/Samara/73/2013, A/Almaty/2958/2013.

Ізоляти A/Zhitomir/286/2014 та A/Zhitomir/290/2014 розташувались серед українських ізолятів поряд з A/Kharkov/201/2014, а серед світових поряд з ізолятами з Німеччини, Румунії, Італії. Вони набули заміщення I214T (ізолейцин замістився на треонін).

Аналізуючи послідовності генів NA житомирських ізолятів, можна зробити висновок, що штами заносились на територію Житомирської області, з-за кордону (Німеччина, Італія). Це відбувається через високий рівень міграції населення, як в середині країни, так і за кордон. Даний висновок ми зробили після визначення дати виявлення вірусів із клінічного матеріалу.

Для філогенетичного аналізу генів NA було використано 65 ізолятів. Аналіз за гену ми нейрамінідази житомирських вірусів грипу показав схожі результати з аналізом послідовностей генів гемаглютиніну (рис. 5.6) Усі досліджувані ізоляти епідемічного сезону 2013-2014 рр. були генетично подібні до вакцинного штаму A/Texas/50/2012, але мали певні генетичні відмінності, тому розділились на групи.

У всіх ізолятах спостерігалися мутації N197D та I444V.

До першої групи відносять віруси із заміщенням I392T – це віруси з різних куточків світу: Кореї, Грузії, Латвії, Румунії та український – A/Kharkov/203/2014 (V396I).

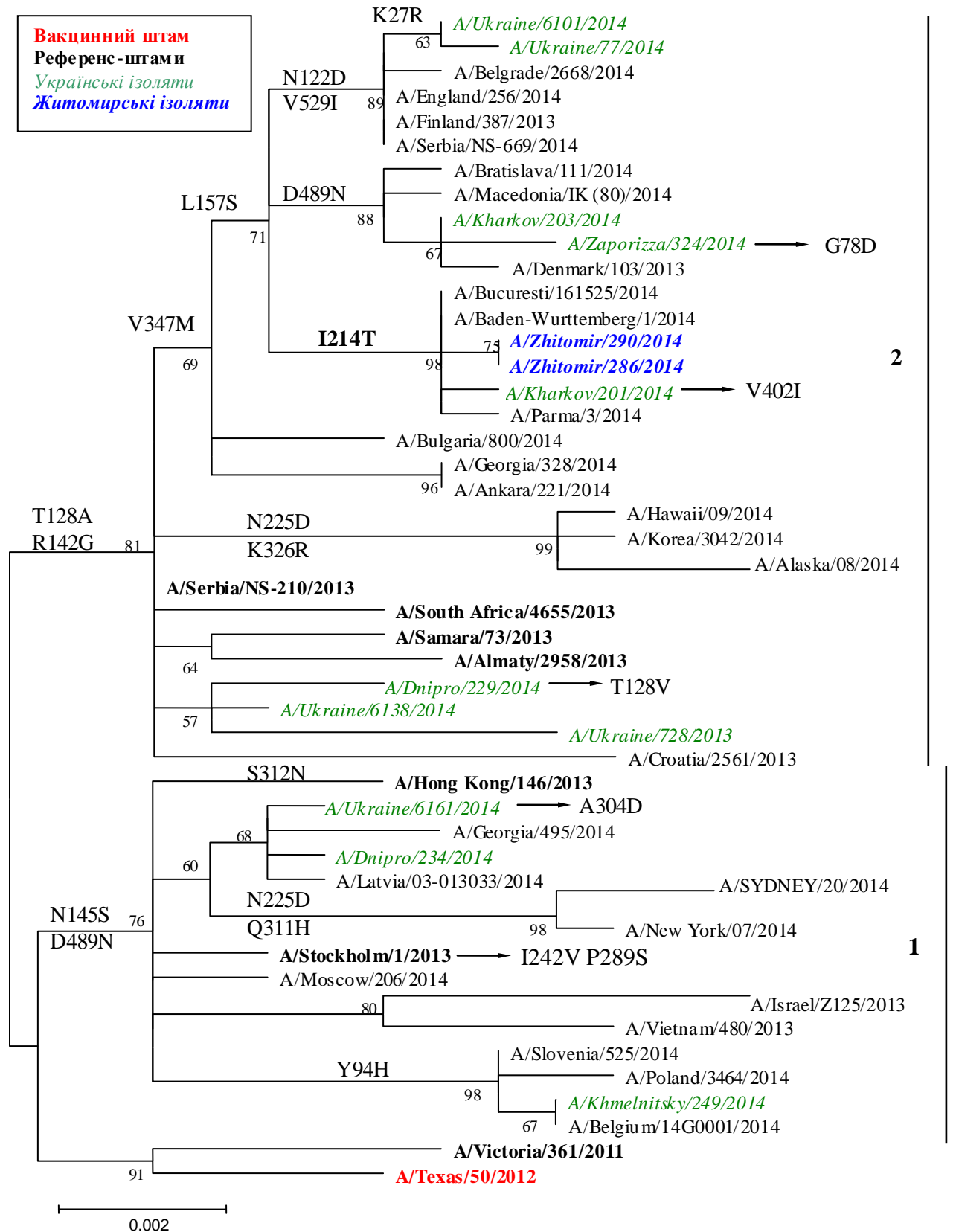


Рис. 5.5 Філогенетичний аналіз послідовностей генів НА ізолятів вірусів грипу А(Н3N2), виділених у Житомирській області, Україні та світі (епідемічний сезон 2013-2014 рр.)

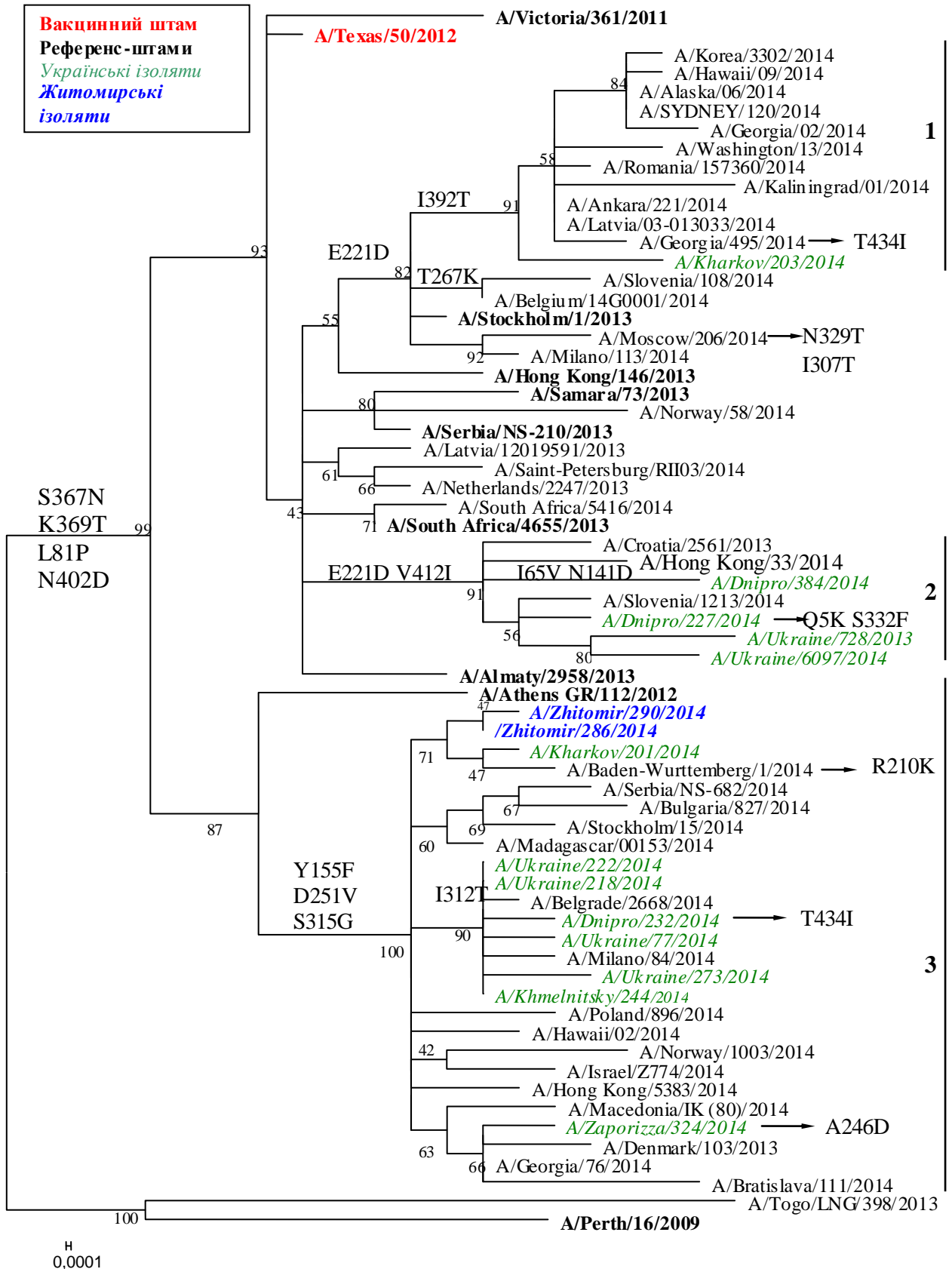


Рис. 5.6 Філогенетичний аналіз послідовностей генів NA ізолятів вірусів грипу А(Н3N2), виділених у Житомирській області, Україні та світі (епідемічний сезон 2013-2014 рр.)

У другій групі із заміщенням V412I розташувались українські ізоляти та ізоляти з Гонконгу, Хорватії, Словенії.

Житомирські ізоляти потрапили до групи, куди увійшли, як українські ізоляти, так і ізоляти з усього світу. В даній групі мали місце такі нові заміщення Y155F, D251V, S315G. Поряд з нашими ізолятами розташувались віруси з Харкова та Баден-Вюртембергу. Дана група дуже гетерогенна та є подібною до A/Athens GR/112/2012, ніж до нових референс-вірусів [12, 138, 139].

Епідемічний сезон 2014-2015 рр. Для проведення філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності генів HA та NA вірусів грипу A(H3N2) даного сезону, вакцинного штаму – A/Texas/50/2012 і A/Switzerland/9715293/2013 та референс-штамів: A/Stockholm/6/2014, A/Norway/466/2014. Досліджувані ізоляти: A/Ukraine-Zh/501/2014, A/Ukraine-Zh/374/2015, A/Ukraine-Zh/6809/2015.

Досліджувані ізоляти епідемічного сезону 2014-2015 рр. також відносяться до генетичної підгрупи 3С генетичного кладу A/Victoria/ 208/2009, але вже до підгрупи 2a, через набуті заміщення L3I, N144S (втрата сайту глікозилування), N145S, F159Y, K160T (отримання сайту глікозилування), N225D та Q311H в HA1 та є найбільш подібні до референс-штаму A/Hong Kong/5738/2014. Ізолят A/Ukraine-Zh/6809/2015 набув заміщення N144R. Ізолят A/Ukraine-Zh/374/2015 входить до групи 3С та подібний до ізолятів, що виділялись в Житомирській області в епідемічному сезоні 2013-2014 рр.

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів нейрамінідази житомирських ізолятів показав заміщення E221D та I392T, а ізолят A/Ukraine-Zh/6809/2015 має заміщення T267K і I380V, яке також властиве генетичній групі 3С.2a.

В заключенні слід, сказати, що всі досліджувані нами ізоляти вірусів грипу, які циркулювали в Житомирській області входять до генетичного кладу A/Victoria/208/2009. Ізоляти, виділені нами вірусів, відносять до різних груп

та підгруп у межах групи. Ізоляти епідемічного сезону 2011-2012 рр. входять до підгрупи 6, штами епідемічного сезону 2013-2014 рр. – до групи 3С, а ізоляти епідемічного сезону 2014-2015 рр. – до підгрупи 2а групи 3С, а A/Ukraine-Zh/374/2015 входить до групи 3С (рис. 5.3).

Отже, можна стверджувати, що віруси грипу А(Н3N2) й надалі чітко утримуються в людській популяції за допомогою антигенного дрейфу. Оскільки поверхневі антигени вірусів грипу є мішенями для імунної системи, то для того щоб віруси утримались в людській популяції, в їх генах відбуваються точкові мутації. За результатами останнього епідемічного сезону можна зробити висновок, що майже за рік відбулися мутації в генах НА та NA вірусу, які вплинули на їх сприйнятливість серед людей [138].

5.3 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу В, які циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.

У постпандемічному епідемічному сезоні 2010-2011 рр. циркулював вірус грипу В гілки В/Victoria/2/87. У цей сезон, хоча більша частка серед виявлених вірусів грипу в зразках, відібраних від хворих на ГРВІ, належала вірусу грипу А(Н1N1) пандемічному, але в його першій декаді, домінуючим був вірус грипу В.

Для проведення філогенетичного аналізу генів гемаглютиніну та нейрамінідази вірусів грипу В гілки В/Victoria/2/87 епідемічного сезону 2010-2011 рр. було використано 46 ізолятів. Серед них вакцинний штам В/Brisbane/60/2008, референс-штами: В/Malaysia/2506/2004, В/Victoria/304/2006, В/Hong Kong/514/2009, В/England/393/2008, В/Paris/1762/2009 та досліджувані нами ізоляти: В/Ukraine-Zh/142/2011, В/Ukraine-Zh/30/2011, В/Ukraine-Zh/7/2011. Послідовності генів НА вірусів грипу з інших країн світу були отримані з бази вірусів грипу GISAID (рис. 5.7, 5.8).

Було проведено порівняння послідовностей генів НА вірусів та на підставі отриманих результатів було побудоване філогенетичне дерево. Усі

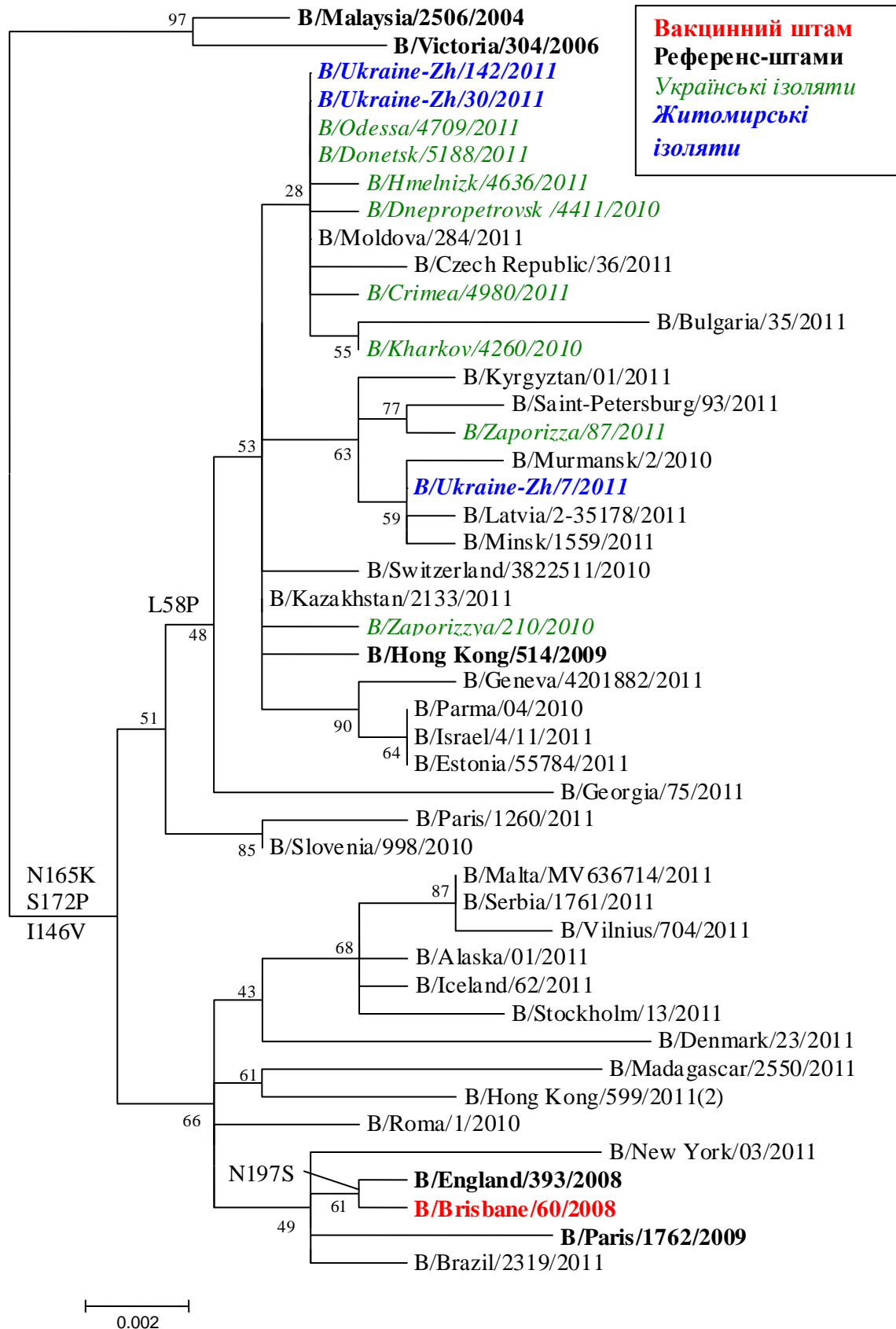


Рис. 5.7 Філогенетичний аналіз вірусів грипу В генетичної гілки B/Victoria/2/87, виділених у Житомирській області, Україні та світі, за послідовностями генів НА (епідемічний сезон 2010-2011 рр.)

досліджувані ізоляти епідемічного сезону 2010-2011 рр. належать до генетичного кладу Brisbane/60/2008 та селектували амінокислотні заміщення (аз) N165K, S172P. Усі штами набули амінокислотні заміщення I146V, що властиво для кладу B/Brisbane/60/2008.

Для проведення філогенетичного аналізу генів нейрамінідази вірусів грипу ізольованих в епідемічний сезон 2010-2011 рр. було використано 43 ізоляти. Всі досліджувані ізоляти епідемічного сезону 2010-2011 рр. відносяться до генетичного кладу Brisbane/60/2008 та набули заміщення E404K, A358E, E320D, I271V N220K, I204V, K125N, S42P, P41S. Залежно від наявності заміщень досліджувані ізоляти можна виділити в групи.

Три житомирських ізоляти входять у велику групу ізолятів, представлених різними країнами світу (Молдови, Росії, Швейцарії, Ізраїлю, Естонії, Казахстану, Киргизстану, Білорусі) та різних регіонів України, які селектували заміщення N199D, L73F, P51S. Вони є подібними до референс-штаму B/Hong Kong/514/2009 (рис. 5.8).

Друга група менша за чисельністю та включає в себе ізоляти з Литви, Латвії, Сербії, Німеччини, США, яка набула заміщення D329N.

В результаті проведення філогенетичного аналізу генів HA та NA житомирських ізолятів, ізольованих у епідемічному сезоні 2010-2011 рр. можна зробити висновок, що вони належать до генетичного кладу Brisbane/60 генетичної гілки B/Victoria/2/87.

В епідемічному сезоні 2014-2015 рр. ми спостерігали також ко-циркуляцію вірусів грипу А та В. В епідемічному сезоні 2014-2015 рр. циркулював вірус грипу В генетичної гілки B/Yamagata/16/88.

Для проведення філогенетичного аналізу були використані нуклеотидні послідовності генів HA та NA вірусів грипу В даного сезону, вакцинних штамів (2014-2015 рр. та 2015-2016 рр.): B/Massachusetts/02/2012, B/Phuket/3073/2013; референс-штамів: B/Hong Kong/3417/2014, B/Novosibirsk/1/2012, B/Stockholm/12/2011, B/Estonia/55669/2011, B/Brisbane/3/2007, B/Florida/4/2006 та досліджувані нами штами: B/Ukraine-Zh/426/2014, B/Ukraine-Zh/148/2015,

B/Ukraine-Zh/497/2014, B/Ukraine-Zh/1/2015, B/Ukraine-Zh/490/2014, B/Ukraine-Zh/6/2015 (рис. 5.9, 5.10).

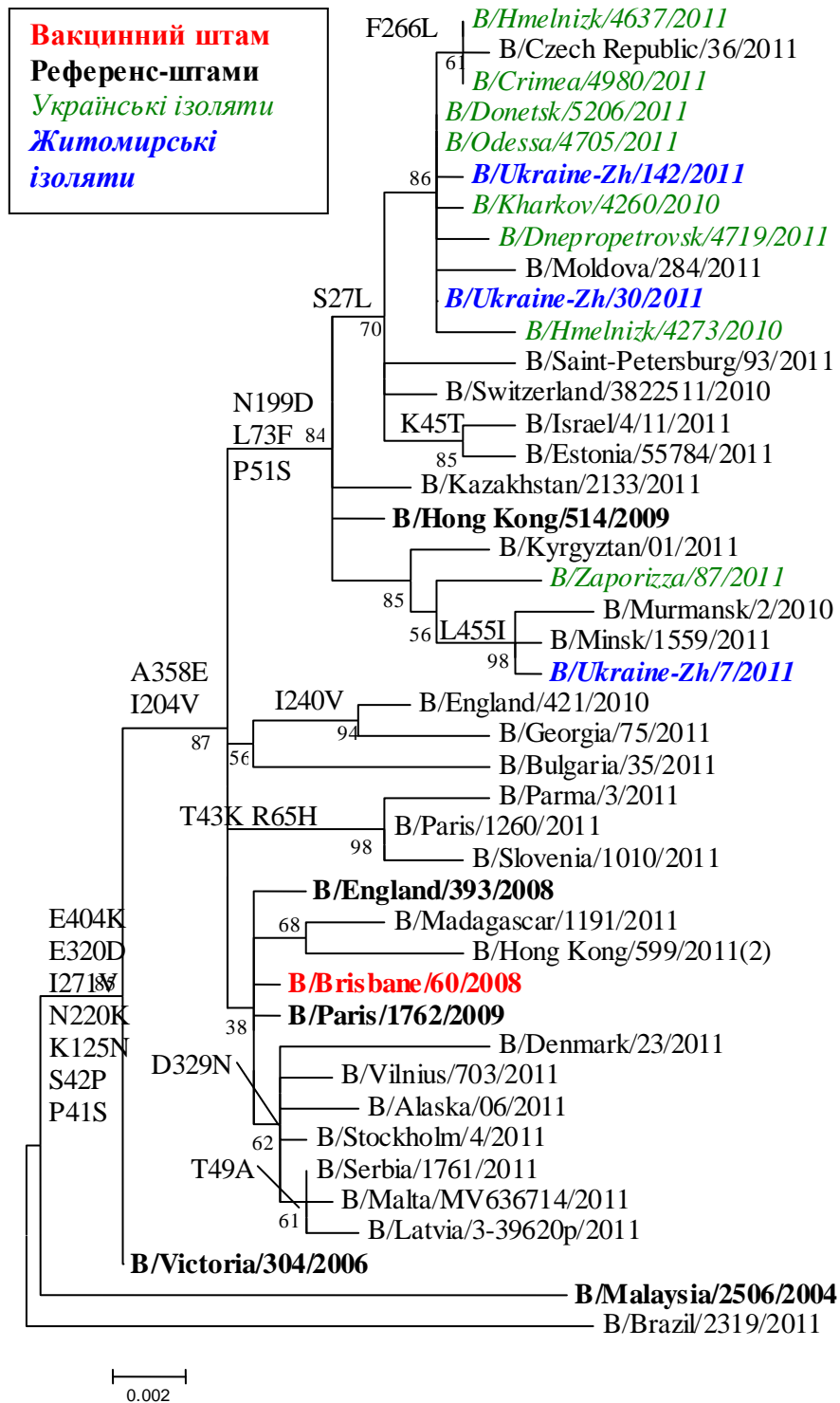


Рис. 5.8 Філогенетичний аналіз ізолятів вірусів грипу В, генетичної гілки B/Victoria/2/87, виділених у Житомирській області, Україні та світі, за послідовностями генів NA (епідемічний сезон 2010-2011 рр.)

Для проведення філогенетичного аналізу послідовностей генів НА вірусів грипу було використано 45 ізолятів.

Усі досліджувані ізоляти набули заміщення N202S, N116K, K298E, E312K та разом з вакцинним штамом V/Phuket/3073/2013 епідемічного сезону 2015-2016 рр. і референс-штамом V/Hong Kong/3417/2014 сформували велику групу (рис. 5.9). В дану групу крім українських, в т.ч. житомирських ввійшли ізоляти з усього світу: США, Англії, Франції, Сербії, Грузії та інших.

Для проведення філогенетичного аналізу нуклеотидних послідовностей генів НА вірусів грипу було використано 45 ізолятів. За результатами проведеного аналізу було побудовано дендрограму.

Усі ізоляти також створили одну велику групу із заміщенням I45V, E320K та складається з ізолятів з усього світу (Румунії, Латвії, Македонії, Швейцарії, Англії, Італії та інші). Наші досліджувані ізоляти: V/Ukraine-Zh/426/2014, V/Ukraine-Zh/148/2015 разом з українськими ізолятами з Хмельницького набули ще й заміщення L74P. Також ізолят V/Ukraine-Zh/6/2015 разом з ізолятами з Німеччини та Ірану селектували заміщення I49T, S295R (рис. 5.10).

Отже, всі досліджувані ізоляти виявились більш подібними до нового вакцинного штаму епідемічного сезону 2015-2016 рр. V/Phuket/3073/2013, ніж до вакцинного штаму даного епідемічного сезону 2014-2015 рр. V/Massachusetts/02/2012.

Філогенетичний аналіз показав, що в епідемічному сезоні 2010-2011 рр. в Житомирській області, як і в Україні в цілому циркулював вірус грипу В генетичної гілки V/Victoria/2/87.

В епідемічному сезоні 2014-2015 рр. був виявлений вірус грипу В генетичної гілки V/Yamagata/16/88. Досліджувані ізоляти епідемічного сезону 2014-2015 рр. були більш подібні до вакцинного штаму V/Phuket/3073/2013 (2015-2016 рр.).

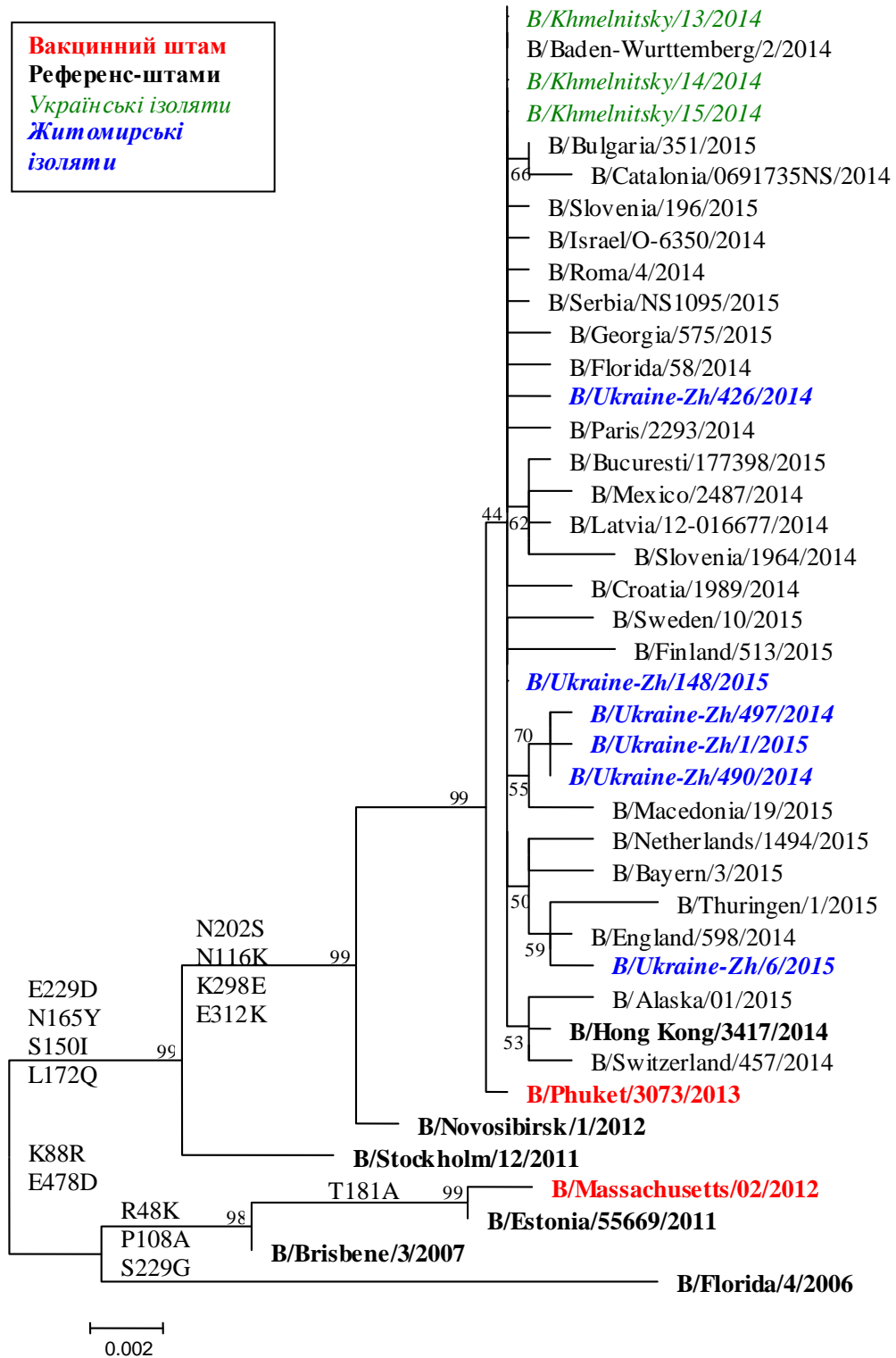


Рис. 5.9 Філогенетичний аналіз ізолятів вірусів грипу В генетичної гілки В/Yamagata/16/88, виділених у Житомирській області, Україні та світі, за послідовностями генів НА (епідемічний сезон 2014-2015 рр.)

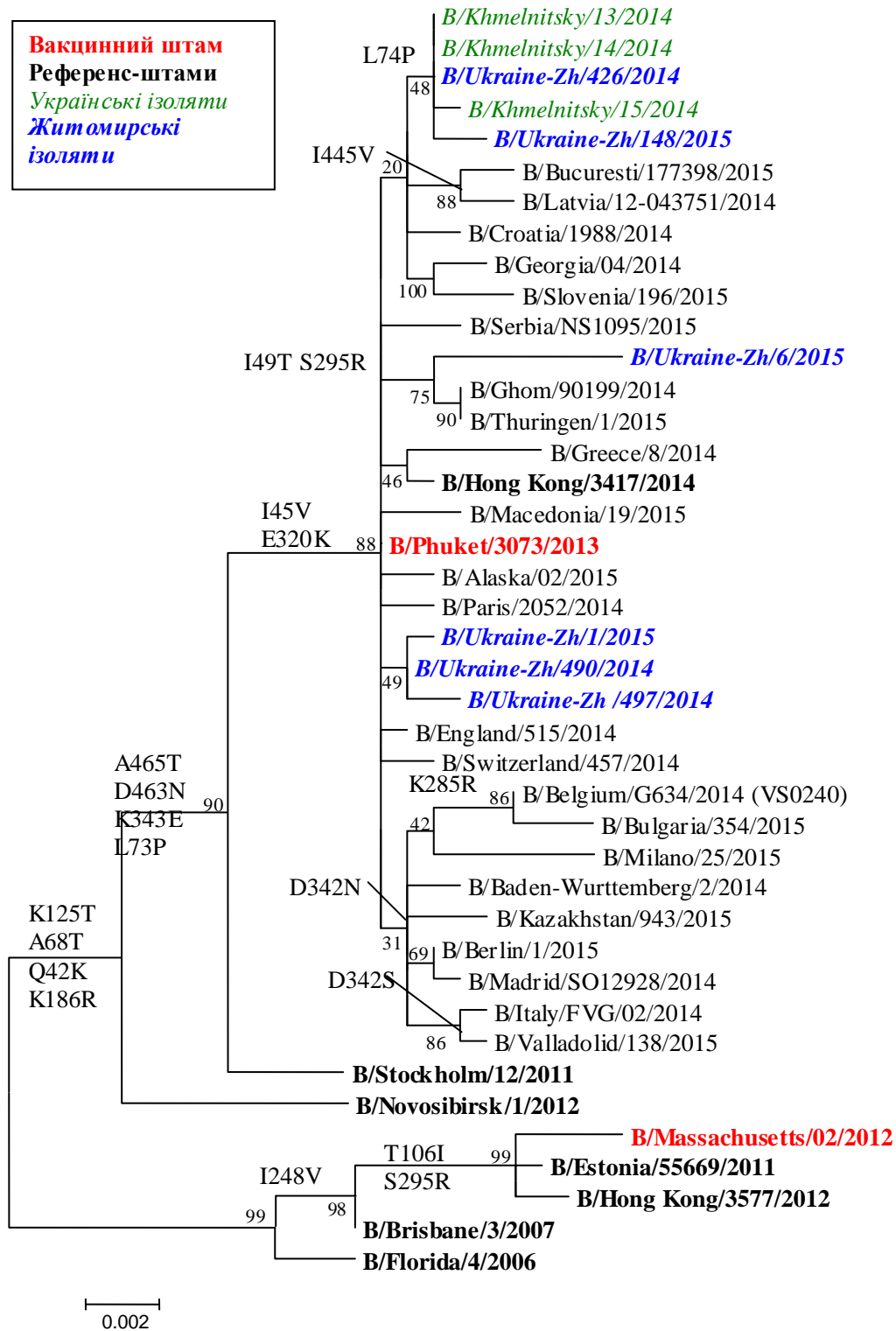


Рис. 5.10 Філогенетичний аналіз ізолятів вірусів грипу В генетичної гілки B/Yamagata/16/88, виділених у Житомирській області, Україні та світі, за послідовностями генів NA (епідемічний сезон 2014-2015 рр.)

Хочемо зауважити, завдяки тому, що вірус грипу В протягом 2009-2015 рр. виявлявся лише у двох сезонах та належав до різних генетичних гілок, в епідемічному сезоні 2014-2015 рр. викликав більш тяжкі наслідки захворювання ніж зазвичай. Дане явище пов'язане з відсутністю або низьким рівнем імунітету серед різних груп населення Житомирської області, та України в цілому [137].

Дані описані в цьому розділі опубліковані автором в наступних друкованих працях: [12, 137, 138, 139].

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Грип щорічно викликає у світі приблизно від 3 до 5 млн випадків важкої хвороби та від 250-500 тис. смертей. У Європі щорічно хворіє близько 20% населення. Епідемії грипу в Північній півкулі виникають в осінньо-зимово-весняний період з переважанням взимку. У даний час циркулює три сезонних віруси грипу: грип А(Н3N2), грипу А(Н1N1)pdm09 та дві генетичні гілки грипу В (Ямагата і Вікторія). Віруси грипу постійно змінюються через антигенний дрейф, що може впливати на терміни і тяжкість сезонних епідемій грипу і вимагає щорічного оновлення штамового складу вакцин для забезпечення кращої відповідності їх циркулюючим вірусам грипу. Безперервне спостереження за грипом є фундаментальним для визначення складу протигрипозних вакцин на наступний епідемічний сезон. Моніторинг за антигенними та генетичними властивостями циркулюючих вірусів дає також можливість виявлення нового вірусу грипу з пандемічним потенціалом у разі його появи у світі [140].

Усі пандемії грипу були викликані новими вірусами грипу А, проти яких люди майже не мають імунітету, що, як правило, призводить до більш важкого перебігу захворювання, ніж при сезонному грипі. Пандемії трапляються через нерівні проміжки часу, дезорганізуючи суспільство та, зокрема, виявляючи недоліки в роботі медичної служби. Так, пандемія грипу 2009 р. виявила недоліки в глобальній системі епіднагляду за грипом, зокрема відсутність стандартизованого підходу до збору даних [141].

Вкрай важливе значення для покращення розуміння епідеміології грипу, періодичності сезонів грипу та наслідків сезонних епідемій, а також для моніторингу циркулюючих штамів вірусу має активна участь в загальноєвропейській діяльності епіднагляду за грипом та публікація отриманих результатів. Результати епідеміологічних та вірусологічних досліджень є підставою для створення науково-доказової бази, яка допоможе

вдосконалити методи боротьби з грипом на регіональному, національному та глобальному рівнях [142].

Виявлення вірусу грипу в матеріалі від хворих на ГПЗ/ГРІ та ТГРІ – основа вірусологічного нагляду за грипом. Типування й субтипсування вірусних ізолятів дозволяє обласним органам охорони здоров'я відслідковувати, які віруси грипу циркулюють серед населення на даній території [140].

Епіднагляд за грипом у різних країнах здійснюються по-різному. У деяких країнах проводиться контроль за грипоподібними (ГПЗ) та тяжкими гострими респіраторними інфекціями (ТГРІ), в інших – діють універсальні системи, у яких усі медичні заклади сповіщають як про випадки ГПЗ та ТГРІ, так і про гострі респіраторні інфекції (ГРІ). Окремо сповіщається про лабораторно підтвержені випадки грипу [140].

У нашій країні, і Житомирська область не виняток, для оцінки епідемічної ситуації враховують загальну кількість випадків грипу та гострих респіраторних інфекцій протягом усього року [143]. Епідеміологічні та вірусологічні дані, які збираються щотижнево з 40-го тижня одного року й до 20-го тижня наступного (епідемічний сезон), використовуються для проведення контролю за грипом [140].

Для здійснення епіднагляду за ГПЗ та ГРІ потрібна інформація про випадки захворювання серед населення за віковими групами, що дає можливість встановити кореляцію між віком та типом і підтипом вірусу. У 33 країнах встановлюється епідемічний поріг для ГПЗ і/або ГРІ, який вказує на початок та кінець епідемічного сезону. У 24 країнах з них використовується стандартний підхід із використанням історичних епідеміологічних даних – побудова рухомої епідемічної кривої. Але епідемічний поріг вираховується по-різному. Основним чинником цього є різні підходи до реєстрації хворих на грип та гострі респіраторні інфекції в різних країнах. В європейських країнах найчастіше використовують методи обчислення епідемічних порогів, порівнюючи показники захворюваності з такими в попередні роки [144]. Такі розрахунки проводять і в Україні, Житомирська область не виняток. У деяких

країнах рівень епідемічного порогу розраховують, виходячи з кількості щотижневих консультацій в попередні роки. В Словаччині використовується метод, в основу якого покладено інформацію про відсутність школярів у школах – зростання вдвічі кількості відсутніх учнів у школах, порівняно з попереднім тижнем, вже вважається перевищенням епідемічного порогу [140, 143].

Отже, епідеміологічний та вірусологічний нагляд за грипом та іншими ГРІ у світі повинен проводитись на всіх рівнях (регіональному, національному, глобальному), що дозволить із високим ступенем вірогідності прогнозувати етіологічну структуру вірусів грипу наступних епідемій. Двічі на рік кожного року після опрацювання даних епідеміологічного та вірусологічного нагляду, ВООЗ дає рекомендації щодо складу вакцин на наступний епідемічний сезон. Також інформація про чутливість вірусів грипу до інгібіторів нейрамінідази є важливою для медиків, які лікують хворих на грип (попередження виникнення резистентних штамів).

Наші дослідження підтверджують, що епідеміологічний та вірусологічний нагляд за грипом та іншими ГРІ повинні проводитись разом на окремих територіях для того, щоб оперативно оцінити ситуацію й провести профілактичні (протиепідемічні) заходи.

Тому першим етапом нашого дослідження було проведення ретроспективного аналізу захворюваності на грип та інші ГРІ серед населення Житомирської області і по районах протягом 17 календарних років.

Майже щороку на грип та ГРІ в Україні хворіє 7-9 млн осіб [145]. Динаміка захворюваності на грип за період з 1999 до 2015 рр. у Житомирській області, як і в Україні в цілому, характеризується певною циклічністю – підйомами, що змінюються спадами. На нашу думку, це пов'язано зі станом популяційного імунітету та змінами в антигенних та генетичних детермінантах збудника (дрейф та шифт).

В результаті проведення ретроспективного аналізу епідемічного процесу грипу в Житомирській області протягом 17 календарних років було виявлено

його згасання. Інтенсивні показники по області становили від 3754,7 на 100 тис. населення (1999) до 285,68 на 100 тис. населення (2015). Показники захворюваності на грип майже збігаються з перебігом захворюваності по області та в Україні в цілому.

Захворюваність на інші ГРІ населення Житомирської області, як і України в цілому, на відміну від захворюваності на грип, реєструється протягом всього календарного року. У цілому захворюваність на інші ГРІ за ці 17 років перебувала на одному рівні. Найвищі показники захворюваності на інші ГРІ населення Житомирської області протягом 1999-2015 рр. спостерігались в I кварталі (5784,1 на 100 тис. – 2010 р.; 6510,32 на 100 тис. – 2011 р.; 6886,43 на 100 тис. – 2015 р.) і не перевищували інтенсивні показники по Україні. Лише в 2015 р. вони були вищі за українські (6886,43 на 100 тис. та 5618,67 на 100 тис. населення, відповідно).

Отже, можна зробити висновок, що офіційна реєстрація не відповідає дійсному рівню захворюваності на грип, оскільки залежить від частоти звернень населення за медичною допомогою.

Однією з причин низької реєстрації захворюваності є зниження кількості населення як в Україні, так і в Житомирській області. За даними Державної служби статистики населення України зменшилось: в 1999 р. – 4991,81 тис. осіб, а на 1 січня 2015 р. – 4292,49 тис. осіб, в Житомирській області спостерігається те саме: в 1999 р. – 1436,0 тис. осіб, а на 1 січня 2015 р. – 1255,966 тис. осіб [146].

Також одним із чинників, що впливають на показники реєстрованої захворюваності, є ситуація, при якій пацієнти з легким перебігом хвороби чи без потреби у виписуванні лікарняного листка не зверталися за допомогою до лікаря. З іншого боку, оскільки ГРВІ мають схожі клінічні ознаки, лікарям складно, особливо на початку захворювання, правильно встановити етіологічний чинник хвороби. Встановлення правильного діагнозу можливе, якщо є типова клініка, що збігається в часі з епідемічним сезоном або є виділення вірусу грипу на даній території. Тому, етіологічна ідентифікація

діагнозу не можлива без виявлення вірусів грипу в клінічних матеріалах від хворих на ГРВІ.

Захворюваність на інші ГРІ серед населення, на відміну від захворюваності на грип, спостерігається протягом всього календарного року, підвищуючись у IV та I кварталах. У 2009 р. ми також спостерігали особливість – захворюваність на інші ГРІ в IV кварталі 2009 р. підвищилась більше, ніж у 50 разів. Отримані результати збігаються з даними щодо захворюваності на грип та інші ГРІ по Україні в цілому [134, 147].

Наступним кроком нашого дослідження було проведення моніторингу грипу серед різних груп населення, визначення штамової належності виявлених у Житомирській області вірусів грипу протягом 2009-2015 рр.

За даними ВООЗ, протягом 2009-2015 рр. як Південній півкулі, так і в Північній півкулі циркулювали всі відомі штами A(H1N1)pdm, A(H3N2) та B [148-163].

В епідемічному сезоні 2009-2010 рр. почав свою циркуляцію новий вірус грипу A(H1N1)pdm. Вірус грипу A(H1N1)pdm у 2009 р. був домінуючим вірусом грипу в більшості країн світу.

У цьому сезоні домінували віруси пандемічного грипу A(H1N1)pdm протягом всього періоду, але в останні місяці спостерігалась поява вірусів грипу A(H3N2) і B обох генетичних гілок.

У даному сезоні віруси грипу A(H1N1)pdm склали 98,19%, віруси грипу A(H3N2) – 0,44% від загальної кількості виявлених вірусів грипу. Віруси грипу B були виявлені тільки у 1,37% від загальної кількості виявлених вірусів.

Виявлені в 2009 р. віруси грипу A(H1N1)pdm, виділені від осіб у Південній півкулі нічим не відрізнялись від вірусів, виділених від осіб у Північній півкулі.

У Німеччині та на сході Польщі відмічали високу активність вірусів грипу серед країн європейського регіону. Піком в передачі вірусів грипу був 6-й тиждень 2010 р. Після цього повідомлялося про зниження активності грипу в усіх країнах Європи.

Усі циркулюючі віруси показали низький відсоток антигенного дрейфу протягом минулого сезону, і були схожі зі штамми, що входили в склад сезонних грипозних вакцин [10, 148,158].

В Україні в даному епідемічному сезоні відбулось поширення вірусів грипу A(H1N1)pdm та B генетичної гілки B/Victoria/2/87, а в Житомирській області ми спостерігали поширення тільки вірусу грипу A(H1N1)pdm. В епідемічний процес були залучені особи працездатного віку від 21 до 50 років, тобто молоде неімунне покоління, що також збігається з даними по Україні, Європи та світу.

Усі досліджувані віруси грипу A(H1N1)pdm були більш подібними до референс-штаму A/Lviv/N6/2009, але не мали заміщення D222G та ввійшли в першу субгрупу кладу A/California/07/2009pdm.

Проведений філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей HA та NA вірусів грипу показав, що їх мінливість знаходиться на низькому рівні та вони були подібними до вакцинного штаму A/California/07/2009pdm.

В епідемічному сезоні 2010-2011 рр. вірус грипу A(H1N1)pdm продовжував активно поширюватись серед населення Північної півкулі. Проте в багатьох країнах він вже не був домінуючим. Вірус грипу A(H1N1)pdm продовжував бути патогенним для молодих дорослих і дорослих людей середнього віку, в той час вірус грипу A(H3N2) викликав більш важке захворювання у людей віком старше 65 років. Вірус грипу типу B більше уражував дитяче населення. В деяких країнах спостерігалась більша кількість важких випадків під час сезону 2010-2011 рр., ніж у попередньому сезоні (Великобританія). Причини цього не з'ясовані.

99% серед виявлених вірусів грипу A(H1N1)pdm і 96% вірусів грипу A(H3N2) були схожі з вакцинними штамми. Близько 91% з усіх вірусів грипу типу B належали до генетичної гілки B/Victoria/2/87, інші – до генетичної гілки B/Yamagata/16/88 [159].

Дані по Україні збігаються зі світовими, але відмінністю було те, що в Україні не було зафіксовано жодного вірусу грипу B генетичної гілки

V/Yamagata/16/88. Своєю чергою в Житомирській області, як і в Україні, на початку епідемічного сезону ми спостерігали поширення вірусу грипу В Вікторіанської гілки, а потім вірусу грипу А(Н1N1)pdm. Чинники такого поширення досі не з'ясовані. Вірус грипу А(Н3N2) виявлений не був. Максимально ураженою віковою групою залишаються особи віком 21-50 р., що також збігається з даними по Україні, Європі та світу.

Виділені віруси грипу А(Н1N1)pdm: A/Ukraine-Zh/3/2011 та A/Ukraine-Zh/60/2011 увійшли в шосту субгрупу, та були більш подібними до референс-штаму A/St.-Petersburg/27/2011, а ізолят A/Ukraine-Zh/182/2011 увійшов у сьому субгрупу та був подібний до референс-штаму A/St.-Petersburg/100/2011. Виявлені віруси були більш подібні вакцинному штаму A/California/07/2009pdm.

Виявлені в епідемічному сезоні 2010-2011 рр. віруси грипу В належали до генетичної гілки В/Victoria/2/87 кладу В/Brisbane/60/2008 та були подібні до вакцинного штаму В/Брисбен/60/2008.

Епідемічний сезон 2011-2012 рр. виявився помірним, ніж зазвичай, у багатьох, але не у всіх європейських країнах. Слід зазначити, що кілька країн Європи повідомили про перевищення рівня летальності серед осіб віком 65 років і старше, який збігся з циркуляцією вірусу грипу А(Н3N2). Домінуючий вірус у кожній країні відрізнявся. Мексика повідомила про майже виключне поширення грипу А(Н1N1)pdm, в той час, як США повідомили про набагато більше випадків виявлення вірусу грипу А(Н3N2). В Канаді було переважання вірусу грипу типу В на національному рівні, відсоток якого збільшився в кінці сезону, але було повідомлення про збільшення випадків виявлення вірусу грипу А(Н3N2) в західних провінціях. В Канаді виявилось, що вірус грипу А(Н1N1)pdm продовжує показувати помітну тенденцію непропорційного впливу на молоді вікові групи.

Майже всі віруси грипу А, виявлені у світі, були антигенно подібні до вірусів, які увійшли до складу сезонної вакцини. Однак, було зазначено збільшення антигенного різноманіття в останній частині сезону серед вірусів

грипу А(Н3N2). В Європі з цим була пов'язана більш низька ефективність вакцини, ніж у попередніх сезонах. Оновлена тривалентна вакцина проти грипу для Північної півкулі мала у своєму складі штам А/Victoria/361/2011. Віруси грипу В генетичної гілки як В/Victoria/2/87, так і В/Yamagata/16/88, були поширені протягом сезону в майже рівних пропорціях у деяких регіонах. Зростає частка вірусів генетичної гілки В/Yamagata/16/88, як наслідок, було запропоновано внести зміни в склад вакцини наступного сезону – рекомендований вірус грипу В/Wisconsin/1/2010 [160].

В епідемічному сезоні 2011-2012 рр. у Житомирській області та в Україні в цілому домінуючим збудником був вірус грипу А(Н3N2). В Україні також спостерігалось поширення вірусів грипу В генетичної гілки В/Victoria/2/87, чого не спостерігалось в Житомирській області. Найбільш ураженими віковими групами діти 0-14 р. та дорослі віком 31-40 р. Зміна віку відбулась завдяки зміні домінуючого збудника.

Віруси грипу А(Н3N2) даного сезону розташувались в шостій генетичній групі генетичного кладу А/Victoria/208 завдяки придбанням заміщень К62Е, К144N (отримання додаткового сайту глікозилування), S214І та Т212А відносно вірусів, що відносять до кладу Perth/16. Маючи заміщення D53N, Y94H, I230V та E280A, вони є більш подібні до референс-штаму А/Iowa/19/2010, ніж до інших референс-вірусів, що використовувались в цьому сезоні.

Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів NA вірусів грипу показав, що наші ізоляти мають заміщення S367N, K369T, N402D, що призводить до отримання додаткового сайту глікозилування в залишку 367.

В епідемічному сезоні 2012-2013 рр. у різних країнах Північної півкулі домінуючі збудники були різними. Вірус грипу А(Н3N2) був найбільш поширений у Північній Америці протягом більшої частини сезону; вірус грипу А(Н1N1)pdm – в Європі, Північній Африці і на Близькому Сході; вірус грипу А(Н3N2) разом із вірусом грипу А(Н1N1)pdm або вірус грипу А(Н3N2) в моноциркуляції спостерігався в країнах Середньої Азії. Вірус грипу В

виявлявся частіше, ніж інші віруси грипу А до кінця сезону тільки в Північній Америці і Європі. Поява вірусу грипу типу В була пов'язана з невеликим продовженням сезону в регіонах, де він з'явився. Сезон був більш тяжким, ніж зазвичай в Північній Америці, зокрема, для осіб віком 65 років, але був схожий на попередні сезони в решті країн з помірним кліматом. В США спостерігалось зростання рівня летальності серед дитячого населення, коли вірус грипу В став більше виявлятися у пробах від хворих.

99% вірусів грипу як А(Н1N1)pdm, так і А(Н3N2) були антигенно схожі з вакцинними штамми: А/California/7/2009 (Н1N1)pdm та А/Victoria/361/2011 (Н3N2). Але ситуація дещо ускладнилась з вірусами грипу В. Переважна більшість вірусів грипу В, виявлених у світі, належали до генетичної гілки В/Yamagata/16/88, і майже всі з них були антигенно схожі з вакцинним штамом В/Wisconsin/1/2010. Віруси грипу В генетичної гілки В/Victoria/2/87 в деяких країнах складали 30% від всіх вірусів грипу В [161].

Протягом сезону в Україні та Житомирській області відбувалось поширення вірусів грипу А(Н1N1)pdm, який був домінуючий в Європі, Північній Африці і на Близькому Сході. В Україні спостерігалось поширення також вірусу грипу В генетичної гілки В/Victoria/2/87. У Житомирській області такого не спостерігалось. Віруси грипу А(Н3N2) також брали участь у епідемічному процесі грипу в Україні. Їх частка складала близько 26% від всіх виявлених в країні вірусів. Найбільш ураженими віковими групами в цьому епідемічному сезоні були діти віком 0-4 р. та дорослі віком 21-40 р. Отже, як в епідемічних сезонах 2009-2010 рр. та 2010-2011 рр., знову спостерігався зв'язок між важким перебігом хвороби та віком.

Досліджувані віруси грипу А(Н1N1)pdm цього сезону увійшли в субгрупу 6С, а ізолят А/Ukraine-Zh/523/2012, що був подібним до референс-штаму А/Hong Kong/5659/2012, увійшов в генетичну групу 6А.

Епідемічний сезон 2013-2014 рр. мав типовий перебіг, в більшості регіонів відмічались піки активності циркуляції вірусів грипу в січні. Сезон показав високу інтенсивність захворюваності, пов'язану з високими

показниками летальності в регіонах, де вірус грипу A(H1N1)pdm був домінуючим. Вірус грипу A(H1N1)pdm був домінуючим, зокрема, в Північній Азії та Північній Америці. В Європі вірус грипу A(H1N1)pdm був виявлений дещо частіше, ніж вірус грипу A(H3N2), обидва віруси спільно циркулювали в регіоні з різним рівнем домінування. На Близькому Сході і в Північній Африці спостерігалась мінливість в найбільш поширених підтипах. Виявлення вірусу грипу В залишалось найнижчим в Європі протягом усього сезону, але в Північній Азії, Північній Америці і Близькому Сході/Північній Африці спостерігався великий відсоток виявлення вірусів грипу В під кінець епідемічного сезону. У регіонах, де найбільш часто виявлявся вірус грипу A(H1N1)pdm, спостерігалось, що молоді люди більш схильні до ураження вірусом, ніж особи віком 65 років. Збільшення випадків ураження цим вірусом в сезоні спричинило зміни у віковій структурі захворілих (хвороба спостерігалась серед осіб віком ≤ 65 і ≥ 15 років).

Більше 99% вірусів грипу A(H1N1)pdm і A(H3N2) були антигенно схожими з вакцинними штамами A/California/7/2009 і A/Texas/50/2012, що вказує на високу відповідність вакцинним штамам. Віруси грипу В були більш схожі з вакцинним вірусом B/Massachusetts/02/2012 (генетична гілка B/Yamagata/16/88) тривалентної вакцини. Решта охарактеризованих вірусів грипу В були подібні до B/Brisbane/60/2008 (генетичної гілки B/Victoria/2/87), який був включений до чотиривалентної вакцини. У деяких регіонах ці віруси склали більше 30% серед протестованих вірусів, а відсоток різниться залежно від регіону [162].

Циркулюючі віруси грипу в Україні були такі, як і у світі. Домінуючим був також вірус грипу A(H3N2). В Житомирській області спостерігалось поширення лише вірусу грипу A(H3N2). Найбільш ураженими були діти віком 0-14 р., що є однією з ознак звичайної епідемії.

Досліджувані віруси грипу A(H3N2) відносяться до третьої підгрупи субкластеру 3С кластеру A/Victoria/208/2009. Вони є подібними до референс-штаму A/Samara/73/2013 завдяки заміщенням T128A (втрата сайту

глікозилювання), R142G та N145S. Усі досліджувані віруси були подібні до вакцинного штаму A/Texas/50/2012.

Активність вірусу грипу в **епідемічному сезоні 2014-2015 рр.** в порівнянні з попередніми сезонами в Північній півкулі досягла свого піку на початку сезону в Північній Америці, а в інших регіонах – на початку 2015 р. Вірус грипу A(H3N2) переважав у більшості регіонів. Збільшилась частка виявлення вірусу грипу В після піку активності вірусу грипу А. Переважання вірусів грипу A(H3N2) та підвищена захворюваність і летальність були подібні до таких, що постерігались в попередніх сезонах грипу. Переважали віруси грипу A(H3N2). З цим був пов'язаний більш важкий перебіг хвороби, особливо серед дорослих віком 65 років, у порівнянні із захворюваністю та летальністю, пов'язаних із грипом A(H1N1)pdm. Під час цього сезону більшу частину циркулюючих вірусів грипу A(H3N2) складали віруси, які відрізнялися від вірусу у вакцинах, використовуваних в Північній півкулі. За оцінками ефективність вакцини була нижчою в порівнянні з результатами попередніх сезонів.

Віруси грипу A(H1N1)pdm були антигенно й генетично схожі з вибраним вакцинним вірусом. Більшість вірусів грипу В, що циркулювали протягом сезону в країнах Північної півкулі, належала до генетичної гілки В/Yamagata/16/88 та були подібні до вакцинного штаму В/Massachusetts/02/2012.

Значна частка вірусів грипу A(H3N2) показала антигенний дрейф, порівняно з вакцинним штамом A/Texas/50/2012 (H3N2). У цьому сезоні більшість вірусів грипу A(H3N2), які були охарактеризовані, антигенно відрізнялися від вакцинного штаму A/Texas/50/2012 (належність за гемаглютиніном (НА) – генетичний група 3С.1), і були антигенно подібні до нового вакцинного штаму A/Switzerland/9715293/2013, який був вибраний в як вакцинний для країн Південної півкулі на епідемічний сезон 2015 р., а в лютому 2015 р. – на епідемічний сезон 2015-2016 рр. для країн Північної півкулі.

Сиквенування генів НА вірусів грипу А(Н3N2), отриманих з Канади, Європи та Великобританії, показало, що найбільша кількість вірусів грипу А(Н3N2) належала до генетичної групи 3С.2а, в той час як лише дуже невелика частка належала до генетичної групи 3С.1. У Китаї, в інших частинах Азії і частині Африки і Східної Європи більшість із сиквенованих вірусів грипу А(Н3N2) належали до генетичної групи 3С.3а.

Віруси грипу В генетичної гілки В/Yamagata/16/88 переважали серед вірусів грипу В, виявлених у цьому сезоні, і були антигенно схожі на В/Phuket/3073/2013, за винятком Канади, Китаю і США, де більшість вірусів В були подібні до вакцинного штаму В/Massachusetts/02/2012. У Європі майже всі віруси грипу В антигенно подібні до генетичної гілки В/Yamagata/16/88. Близько 70% з них були антигенно подібні до В/Phuket/3073/2013, а близько 20% були подібні до В/Massachusetts/02/2012 [163].

З досліджуваного періоду даний сезон найбільш цікавий та особливий. Результати проведених досліджень збіглися з даними по Україні, спостереженнями в Європі та світі. А особливістю епідемічного сезону 2014-2015 рр. є те, що ми спостерігали ко-циркуляцію всіх трьох штамів вірусів грипу. На нашу думку, цьому сприяло проведення в східній частині України антитерористичної операції, яка сприяє більш активним процесам міграції, як в середині країни, так і за кордон. Найбільш ураженими були діти віком 0-4 р. та дорослі віком 15-30 р. та 31-40 р.

Досліджувані віруси А(Н1N1)pdm набули заміщення К163Q, А256Т та були подібними до референс-штаму А/South Africa/3626/2013. Вірус грипу А/Ukraine-Zh/6786/2015 набув заміщення, яке також спостерігалось у референс-штаму А/Lviv/N6/2009 D222G. Це заміщення у вірусах часто асоціюється із тяжким перебігом хвороби. Дані віруси грипу увійшли в субгрупу 6В.

Досліджувані віруси грипу А(Н3N2) також належать до генетичної підгрупи 3С генетичного кладу А/Victoria/ 208/2009, але вже до підгрупи 2а. Вони були найбільш подібні до референс-штаму А/Hong Kong/5738/2014. Ізолят

A/Ukraine-Zh/374/2015 входить до групи 3С та подібний до ізолятів, які виділялись в Житомирській області в епідемічному сезоні 2013-2014 рр.

Усі досліджувані віруси грипу В набули заміщення N202S, N116K, K298E, E312K та разом з вакцинним штамом В/Phuket/3073/2013 епідемічного сезону 2015-2016 рр. і референс-штамом В/Hong Kong/3417/2014 сформували велику групу. В дану групу крім українських, зокрема житомирських ввійшли ізоляти з усього світу: США, Англії, Франції, Сербії, Грузії та інших.

Досліджувані віруси грипу В були більш подібні до нового вакцинного штаму В/Phuket/3073/2013 епідемічного сезону 2015-2016 рр., ніж до вакцинного штаму даного епідемічного сезону 2014-2015 рр. В/Massachusetts/02/2012.

Отже, результати наших досліджень збігаються з даними ВООЗ, які одержані з інших країн Північної півкулі. Всі досліджувані ізоляти були чутливими до інгібіторів нейрамінідази. Щороку домінуючий збудник епідемії в Україні збігався з таким у країнах Європи, що говорить про заносний характер епідемії в Україні [164]. Але в Житомирській області в деяких епідемічних сезонах відмічалася моноциркуляція вірусів грипу. В епідемічному сезоні 2012-2013 рр. на території Житомирської області виявлявся тільки вірус грипу А(H1N1)pdm, а в 2013-2014 рр. ми спостерігали циркуляцію тільки вірусу грипу А(H3N2). Але згідно зі звітами центрів грипу в Лондоні та Атланті дані віруси грипу були домінуючими як в Україні, так і в багатьох країнах світу. На нашу думку, моноциркуляція вірусів грипу в даних епідемічних сезонах відбувалась за відсутності занесення інших штамів вірусів грипу з інших областей України та з-за кордону й також залежить від популяційного імунітету населення до інших штамів вірусів грипу.

Найбільш ураженими віковими групами протягом 2009-2015 рр. були діти віком 0-4 р. та дорослі віком 21-30 р.; 31-40 р.; 41-50 р. Причинами цього, на нашу думку, є те, що діти даної вікової групи вперше стикаються з інфекцією, вони неімунні й тому частіше хворіють. А високий відсоток виявлення вірусів грипу серед дорослого населення можна пояснити процесами

міграції та більш тісними контактами між людьми. Дані є характерними для захворюваності на грип та інші ГРІ [145]. Отримані результати збігаються з літературними даними [5].

У кожному епідемічному сезоні спостерігається циркуляція як вірусів грипу, так і інших респіраторних вірусів. Тому ми провели диференційну діагностику грипу та інших ГРВІ.

Усі ГРВІ мають схожі клінічні ознаки. Отже, проведені дослідження показали доцільність її використання. Можна стверджувати, що під час епідемії грипу в Житомирській області крім вірусів грипу циркулюють також аденовіруси, коронавіруси двох груп (HKU1/OC43 та NL63/229E), метапневмовірус та риновіруси. Крім моноінфекції ми спостерігали наявність мікст-інфекції (у епідемічному сезоні 2012-2013 рр. – CoV (HKU1/OC43) + RhV, а в епідемічному сезоні 2013-2014 рр. – AdV + RhV). Результати, які ми отримали збігаються з літературними даними [165].

У протестованих зразках, зібраних у період епідемічного підйому грипу, ми не виявили вірусів парагрипу та респіраторно-синцитіального вірусу. За повідомленнями ВООЗ, дані віруси виявляються напередодні поширення вірусів грипу, що підтверджує наші результати [149].

При проведенні наших досліджень було виявлено 64% негативних зразків, як на грип, так і на інші 9 респіраторних патогенів. Ми вважаємо, що високий відсоток виявлених негативних зразків може бути внаслідок того, що всі відомі тест-системи визначають найбільш поширені збудники ГРВІ, хоча існує більше 200 вірусів, які здатні викликати ураження респіраторного тракту людини. Не всі віруси досконало вивчені, тому інші респіраторні віруси залишаються не діагностованими.

Крім того, зразки могли бути відібрані в пізні терміни або якість взяття зразків була незадовільною. Тому потрібно більше проводити навчальну роботу серед середнього персоналу лікувальних закладів щодо відбору та транспортування матеріалу, відібраного для дослідження на респіраторні віруси.

Такі дослідження в Україні проводять ще лише в декількох областях (Львівська, Запорізька, Київська) [164]. Але для повного розуміння поширення та етіологічної структури інших ГРВІ доцільно проводити такі дослідження на всіх окремих територіях країни. Це, своєю чергою, зробить більш достовірними показники захворюваності як на грип, так і на інші ГРІ населення і Житомирської області й України в цілому.

Проведені дослідження на прикладі Житомирської області дали можливість встановити, що проведення епідеміологічного та вірусологічного нагляду на окремих територіях дає можливість провести диференційну діагностику грипу та ГРВІ, що, своєю чергою дозволить верифікувати показники захворюваності як на грип, так і на інші ГРІ населення Житомирської області й України в цілому. Завдяки цьому можна швидко проводити протиепідемічні та профілактичні заходи щодо уповільнення або запобігання підвищенню захворюваності на грип та інші ГРІ.

Проведення вірусологічного нагляду дозволить визначити етіологічну структуру популяції вірусів грипу. А подальше спостереження за антигенними властивостями циркулюючих серед населення вірусів грипу на окремій території щороку необхідне для визначення нового штамового складу протигрипозних вакцин. Проведення досліджень на перевірку вірусів грипу, виділених на окремих територіях, на чутливість до інгібіторів нейрамінідази дасть можливість виявити резистентні штами. Дана інформація дуже важлива для проведення коректного лікування хворих на грип.

А накопичення результатів в сукупності з таким наглядом дасть можливість прогнозування майбутніх епідемій та пандемій.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено важливу та актуальну науково-практичну проблему – за допомогою епідеміологічного та вірусологічного нагляду досліджено інтенсивність та етіологічні чинники епідемічного процесу грипу та інших ГРІ в Житомирській області, а також генетичні зміни, які відбулися у циркулюючих вірусах грипу, що дозволить оперативно оцінювати ситуацію і проводити профілактичні (протиепідемічні) заходи.

Основні результати надані у висновках:

1. Захворюваність на грип населення Житомирської області та України в цілому протягом 17 календарних років має тенденцію до зниження.
2. Виявлена особливість етіологічної структури популяції вірусів грипу в Житомирській області протягом 2009-2015 рр., яка відрізняється від України та інших країн Європи та світу. Вірус грипу А(Н1N1)рdm на території Житомирської області виявлявся у чотирьох, вірус грипу А(Н3N2) – в трьох, вірус грипу В – у двох епідемічних сезонах.
3. Проведена диференційна діагностика ГРВІ методом ПЛР у реальному часі показала, що під час епідемій грипу серед населення Житомирської області крім вірусів грипу виявлялись інші респіраторні віруси, а саме аденовіруси, коронавіруси обох груп (НКУ1/ОС43 та NL63/229Е), метапневмовіруси та риновіруси. Високий відсоток виявлених негативних зразків пов'язаний з тим, що доступні до використання діагностичні набори здатні виявляти лише найбільш поширені збудники ГРВІ.
4. Ізоляти вірусів грипу А(Н1N1)рdm чотирьох епідемічних сезонів суттєвих мутацій в генах поверхневих білків вірусів не набули. Всі досліджувані ізоляти залишались антигенно подібними до вакцинного штаму А/California/07/2009рdm, що підтверджено філогенетичним аналізом.

5. Віруси грипу А(Н3N2) й надалі чітко утримуються в людській популяції за допомогою антигенного дрейфу, який відбувається в генах поверхневих антигенів вірусу. Так ізоляти епідемічного сезону 2013-2014 рр. були більш подібні до вакцинного штаму А/Texas/50/2012, а вже ізоляти наступного епідемічного сезону антигенно подібні до нового вакцинного штаму А/Switzerland/9715293/2013.
6. Виявлено, що на відміну від широкого розповсюдження вірусів грипу В двох генетичних гілок у світі, в Житомирській області в різних епідемічних сезонах (2010-2011 рр. та 2014-2015 рр.) виявлялись віруси грипу В різних генетичних гілок. Показано, що ізоляти сезону 2010-2011 рр. є більш подібними до референс-штаму В/Hong Kong/514/2009. Ізоляти сезону 2014-2015 рр. виявились більш подібними до нового вакцинного штаму епідемічного сезону 2015-2016 рр. В/Phuket/3073/2013, ніж до вакцинного штаму даного епідемічного сезону 2014-2015 рр. В/Massachusetts/02/2012.
7. Вперше, на прикладі двох епідемічних сезонів протягом 2009-2015 рр., показано моноциркуляцію штамів вірусів грипу (епідемічні сезони 2012-2013 рр. (А(Н1N1)pdm) та 2013-2014 рр. (А(Н3N2)), хоча в різних країнах світу в даних епідемічних сезонах спостерігалась ко-циркуляція всіх трьох штамів вірусів грипу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вирусологический надзор за гриппом и другими ОРВИ в Житомирской области / О. Г. Бояльська, И. М. Киричук, А. П. Мироненко, Л. В. Радченко // Вісник проблем біології та медицини. – 2015. – Том 3(120) № 2. – С. 95–100.
2. Dynamics of flue morbidity among the population of Zhytomyr region / O. Boyalska, I. Kyrychuk, O. Shpyta, A. Boyko // Агроекологічний журнал. – 2014. – Vol. 4. – С. 106–109.
3. Survey of causative agents for acute respiratory infections among patients in Khartoum- State, Sudan, 2010–2011 / K. A. Enan, T. Nabeshima, T. Kubo et al. // Virology Journal. – 2013. – Vol. 10. – P. 312–321.
4. Infection Prevention and Control of Epidemic- and Pandemic-Prone Acute Respiratory Infections in Health Care // World Health Organization, Geneva. – 2014. – 156 p.
5. Li H. Epidemiological analysis of respiratory viral etiology for influenza-like illness during 2010 in Zhuhai, China / H. Li, Q. Wei, A. Tan, L. Wang // Virology Journal. – 2013. – Vol. 10 (143). – P. 2–9.
6. Freitas F. T. M. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000–2010/ Felipe Teixeira de Mello Freitas // Brazilian Journal of Infectious diseases. – 2013. – Vol. 17 (1). – P. 62–68.
7. Laboratory Surveillance of Influenza-Like Illness in Seven Teaching Hospitals, South Korea: 2011– 2012 Season / Ji Yun Noh, Joon Young Song, Hee Jin Cheong et al. // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8. – Issue 5. – P. 1–9.
8. Taubenberger J. K. Pandemic influenza: certain uncertainties / J. K. Taubenberger // Rev. Med. Virol. – 2011. – Vol. 21 (5) – P. 262–284.
9. Retrospective analysis of influenza-induced morbidity in populations of Zhytomyr region during 1999–2011 / O. Boyalska, I. Kyrychuk, O. Shpyta, A. Boyko // Вісник. КНУ. – Сер. Біол. – 2013. – № 3 (65). – С. 20–21.

10. Поширення вірусу грипу серед різних груп населення Житомирської області / О. Бояльська, І. Киричук, О. Шпита, А. Бойко // Вісник. КНУ. – Сер. Біол. – 2014. – № 2 (67). – С. 25–28.
11. Genetic variation analysis of hemagglutinin and neuraminidase of human influenza A(H3N2) virus in Hong Kong (1997–2006) / S. Zhang, J. Y. Chen, J. Rao et al. // African Journal of Microbiology Research. – 2014. – Vol. 8 (18). – P. 1863–1893.
12. Phylogenetic analysis of influenza A viruses (H3N2) circulating in Zhytomyr region during 2013–2014 epidemic season / O. G. Boyalska, I. M. Kyrychuk, I. G. Budzanivska et al. // Biopolymers and cell. – 2015. – Vol. 31 (3). – P. 226–232.
13. Molecular Epidemiology of Influenza A/H3N2 Viruses Circulating in Mexico from 2003 to 2012 // M. Escalera-Zamudio, M. I. Nelson, A. G. Güemes et al. / Plos one. – 2014. – Vol. 9 (7). – P. 1–11.
14. Ten-Year (1999–2009) Epidemiological and Virological Surveillance of Influenza in South Italy (Apulia) / A. Campa, M. Quattrocchi, M. Guido et al. // Influenza Research and Treatment. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1–7.
15. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza // WHO Global Influenza Surveillance Network. – 2011. – 153 p.
16. Jones B. Spreading the word about seasonal influenza / B. Jones // Bull. World Health Organ. – 2012. – Vol. 90. – P. 253–253.
17. Bouvier N. M. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission / N. M. Bouvier, A. C. Lowen // Viruses-Basel. – 2010. – Vol. 2 (8). – P. 1530–1563.
18. Tregoning J. S. Immunology causes, clinical symptoms, virology and respiratory viral infections in infants / J. S. Tregoning, J. Schwarze // Clinical microbiology. – 2010. – Vol. 23 (1). – P. 74–98.
19. Bocavirus in children with respiratory tract infections / L. Guo, R. Gonzalez, Z. Xie, H. Zhou et al. // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 17 (9). – P. 1775–1777.

20. Prevalence of adenovirus in children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China / Y. Jin, R. Zhang, Zh. Xie et al. // *Virology Journal*. – 2013. – Vol. 10. – P. 271–278.
21. Russell W. C. Adenoviruses: update on structure and function / W. C. Russell // *Journal of General Virology*. – 2009. – Vol. 90. – P. 1–20.
22. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): Guidelines for Diagnosis and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza Virus, Metapneumovirus, Rhinovirus, and Coronavirus / Hans H. Hirsch, Rodrigo Martino, Katherine N. Ward et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 56 (2). – P. 258–266.
23. Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus / Han-Bo Shin, Myung-Soo Choi, Byeol Ryu et al. // *Virology Journal*. – 2013. – Vol. 10 (1). – P. 303–313.
24. Wright M. Respiratory syncytial virus prevention and therapy: past, present, and future / M. Wright, G. Piedimonte // *Pediatric Pulmonology*. – 2011. – Vol. 46. – P. 324–347.
25. Hospitalization due to human parainfluenza Virus–Associated Lower Respiratory Tract Illness in Rural Thailand / O. W. Morgan, M. Chittaganpitch, B. Clagueet et al. // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2013. – Vol. 7(3). – P. 280–285.
26. Single detection of human bocavirus with a high viral load in severe respiratory tract infections in previously healthy children / Lili Zhou, Shouyan Zheng, Qiuyan Xiao et al. // *BMC Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 14. – P. 424–431.
27. Evidence for the interaction of the human metapneumovirus G and F proteins during virus-like particle formation / Liat Hui Loo, Muhammad Raihan Jumat, Yi Fu et al. // *Virology Journal*. – 2013. – Vol. 10. – P. 294–306.
28. Щелканов М. Ю. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности / М. Ю. Щелканов, Л. В. Колобухина, Д. К. Львов // *Лечащий врач*. – 2013. – Vol. 10. – С. 1–6.

29. Human Rhinoviruses / S. E. Jacobs, D. M. Lamson, K. St. George, T. J. Walsh // *Clinical Microbiology*. – 2013. – Vol. 26. – P. 135–162.
30. Ducatez M. F. Influenza D Virus in Cattle, France, 2011–2014 / M. F. Ducatez, C. Pelletier, G. Meyer // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 21 (2). – P. 368–371.
31. Jackson D. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era / D. Jackson, R. A. Elderfield, W. S. Barclay // *Journal of General Virology*. – 2011. – Vol. 92. – P. 1–17.
32. Медицинская вирусология: Руководство / [под ред. Д. К. Львова]. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008. – С. 176–183, 382–393.
33. Сахарчук И. И. Вирусные заболевания: клиника, диагностика, лечение / И. И. Сахарчук. – К. : Книга плюс, 2006. – С. 18–36.
34. Shinde V. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005–2009 / V. Shinde, C. B. Bridges, T. M. Uyeki et al. // *The New England journal of Medicine* – 2009. – Vol. 360. – P. 1–10.
35. Маянский А. Н. Вирус гриппа А: строение, экология, патология / А. Н. Маянский // *Вопросы диагностики в педиатрии*. – 2009. – Т. 1, № 6. – С. 8–13.
36. Taubenberger J. K. Pandemic influenza – including a risk assessment of H5N1 / J. K. Taubenberger, D. M. Morens // *Scientific and Technical Review*. – 2009. – Vol. 28. – P. 187–202.
37. Family - Orthomyxoviridae / McCauley J. W., Hongo S., Kaverin N. V. et al. // *Virus taxonomy : ninth report of the international committee on taxonomy of viruses* [King A. M. Q., Lefkowitz E., Adams M. J., Carstens E. B., editors]. – San Diego: Elsevier. – 2012. – P. 749–761.
38. Tscherne D. M. Virulence determinants of pandemic influenza viruses / D. M. Tscherne, A. Garcia-Sastre // *Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Vol. 121 (1). – P. 6–13.

39. Emergence of a novel swine – origin influenza A(H1N1) virus in humans / F. S. Dawood, S. Jain, L. Finelli et al. // *The New England journal of Medicine* – 2009. – Vol. 360. – P. 2605–615.
40. Посібник з медичної вірусології / В. М. Гирін, В. Г. Порохницький, С. Г. Вороненко та ін. [За ред. В.М. Гирина]. – К.: Здоров'я, 1995. – С. 368.
41. Малый В. П. Грипп: пособие для врачей / В. П. Малый, М. Г. Романцов, Т. В. Сологуб. – СПб. – Харьков: Тактик – Студио, 2007. – 108 с.
42. Taubenberger J. K. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation / J. K. Taubenberger, J. C. Kash // *Cell Host Microbe*. – 2010. – Vol. 7. – P. 440–451.
43. Emerging, novel, and known influenza virus infections in humans / J. W. Tang, N. Shetty, T. T. Lam, K. L. Hon // *Infectious Disease Clinics of North America* – 2010. – Vol. 24. – P. 603–617.
44. Shanks G. D. Pathogenic responses among young adults during the 1918 influenza pandemic / G. D. Shanks, J. F. Brundage // *Emerging Infectious Disease*. – 2012. – Vol. 18. – P. 201–207.
45. 1917 avian influenza virus sequences suggest that the 1918 pandemic virus did not acquire its hemagglutinin directly from birds / T. G. Fanning, R. D. Slemons, A. H. Reid et al. // *Virology Journal*. – 2002. – Vol. 76. – P. 7860–7862.
46. Lessons from the past: Familial aggregation analysis of fatal pandemic influenza (Spanish flu) in Iceland in 1918 / M. S. Gottfredsson, B. V. Halldorsson, S. Jonsson et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* . – 2008. – Vol. 105(4). – P. 1303–1308.
47. Taubenberger J. K. Influenza: The Once and Future Pandemic / J. K. Taubenberger, D. M. Morens // *Public Health Reports*. – 2010. – Vol. 125 – P. 16–26.

48. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early finding / C. Fraiser, C. A. Donnelly, S. Cauchemez et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – P. 1556–1561.
49. Neumann G. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus / G. Neumann, T. Noda, Y. Kawaoka // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – P. 931–939.
50. Basler C. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and Southeast Asian H5N1 influenza A viruses / C. Basler, P. V. Aguilar // *Antiviral Research*. – 2008. – Vol. 79 (3). – P. 166–178.
51. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle / Y. Matsuoka, H. Matsumae, M. Katoh, A. J. Einfeld // *BioMed Central Systems Biology*. – 2013. – Vol. 7 (97). – P. 1–18.
52. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins / A. V. Vasin, O. A. Temkina, V. V. Egorov, S. A. Klotchenko et al. // *Virus Research*. – 2014. – Vol. 185. – P. 53–63.
53. Structure of influenza viruses, connected with influenza life cycle / L. Krejcova, P. Michalek, D. Hynek et al. // *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. – 2015. – Vol. 1. – P. 13–19.
54. Bouvier N. M. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission / N. M. Bouvier, A. C. Lowen // *Viruses-Basel*. – 2010. – Vol. 2 (8). – P. 1530–1563.
55. Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals / M. Imai, S. Herfst, E. M. Sorrell et al. // *Virus Research*. – 2013. – Vol. 178 (1). – P. 15–20.
56. Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle / T. Samji // *Yale journal of biology and medicine*. – 2009. – Vol. 82. – P. 153–159.
57. Watanabe T. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle / T. Watanabe, S. Watanabe, Y. Kawaoka // *Cell Host & Microbe*. – 2010. – Vol. 7 (6). – P. 427–439.

58. Organization of the Influenza Virus Replication Machinery / A. Moeller, Robert N. Kirchdoerfer, Clinton S. Potter et al. // *Science*. – 2012. – Vol. 338 (6114). – P. 1631–1634.
59. Surface glycoproteins of influenza A H3N2 virus modulate virus replication in the respiratory tract of ferrets / Xing Cheng, James R. Zengel, Qi Xu, Hong Jin // *Virology*. – 2012. – Vol. 432 (1). – P. 91–98.
60. De Jong M. D. Avian influenza A (H5N1) / D. M. De Jong, T. T. Hein // *Journal of Clinical Virology*. – 2006. – Vol. 35. – P. 2–13.
61. Противірусні лікарські засоби при лікуванні грипу: ефективність та безпека / О. П. Вікторов, В. П. Ширококов, О. В. Матвєєва та інші // *Український медичний часопис*. – III/IV 2010. – № 2 (76). – С. 7–12.
62. Nucleocytoplasmic Shuttling of Influenza A Virus Proteins / J. Li, M. Yu, W. Zheng, W. Liu // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – P. 2668–2682.
63. Receptor binding and pH stability - how influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection / C. M. Mair, K. Ludwig, A. Herrmann, C. Sieben // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – Vol. 1838 – P. 1153–1168.
64. Laursen N. S. Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses / N. S. Laursen, I. A. Wilson // *Antiviral Research*. – 2013. – Vol. 98. – P. 476–483.
65. Observed association between the HA1 mutation D 222g in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010 / A. Kilander., R. Rykkvin, S. G. Dudman, O. Hungnes // *Eurosurveillance*. – 2010. – Vol. 15 (9). – P. 1–3.
66. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA and NA in the high virulence virus / C. Papas, P. V. Aguilar, C. F. Basler et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 3064–3069.

67. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus / J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey et. al. // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 404–410.
68. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа А /H1N1sw1 в рецепторсвязывающем сайте HA1 гемагглютинаина / Н. В. Бовин, Е. И. Бурцева, Н. А. Малышев и др. // *Вопросы вирусологии*. – 2010. – № 4. – С. 5–9.
69. Xu R. Structural characterization of an early fusion intermediate of influenza virus hemagglutinin / R. Xu, I. A. Wilson // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – P. 5172–5182.
70. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. / H. M. Wise, A. Foeglein, J. Dalton Sun et al. // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 3. – P. 8021–8031.
71. Han T. Structural basis of influenza virus neutralization / T. Han, W. A. Marasco // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 1217. – P. 178–190.
72. Sriwilaijaroen N. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus / N. Sriwilaijaroen, Y. Suzuki // *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*. – 2012. – Vol. 88 (6) – P. 226–249.
73. Генетические характеристики пандемического вируса гриппа А/ H1N1 2009 г. и вирусов птичьего гриппа А/Н5N1 / Хайтович А. Б., Шварсалон Н. К., Ильичев Ю. А. [и др.] // *Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского*. – Симферополь. – 2009. – Том 145, часть V. – С. 30–36.

74. Role of the host genetic variability in the influenza A virus susceptibility / A. C. Arcanjo¹, G. Mazzocco, S. F. de Oliveira et al. // *Acta Biochimica Polonica*. – 2014. – Vol. 61 (3). – P. 403–419.
75. Shen X. Novel hemagglutinin-based influenza virus inhibitors / X. Shen, X. Zhang, S. Liu // *Journal of Thoracic Disease*. – 2013. – Vol. 5 (2). – P. 149–159.
76. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase / M. Cohen, X–Q. Zhang, H. P. Senaati et al. // *Virology Journal*. – 2013. – Vol. 10. – P. 321.
77. Basler C. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and Southeast Asian H5N1 influenza A viruses / C. Basler, P. V. Aguilar // *Antiviral Research*. – 2008. – Vol. 79 (3). – P. 166–178.
78. Штиря Ю. А. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция / Ю. А. Штиря, Л. В. Мочалова, Н. В. Бовин // *Acta naturae*. – 2009. – № 2. – С. 28–35.
79. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines / L. Deng, K. J. Cho, W. Fiers, X. Saelens // *Vaccines*. – 2015. – Vol. 3. – P. 105–136.
80. Genome packaging in influenza A virus / E. C. Hutchinson, J. C. von Kirchbach, Julia R. Gog, Paul Digard // *Journal of General Virology*. – 2010. – Vol. 91. – P. 313–328.
81. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response / B. W. Jagger, H. M. Wise, J. C. Kash et al. // *Science*. – 2012. – Vol. 337. – P. 199–204.
82. Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA / Y. Muramoto, T. Noda, E. Kawakami et al. // *Journal of Virology*. – Vol. 87 (5). – P. 2455–2462.
83. Computational Analysis and Mapping of Novel Open Reading Frames in Influenza A Viruses / Yu-Nong Gong, Guang-Wu Chen, Chi-Jene Chen et al. // *Plos one*. – 2014. – Vol. 9 (12). – P. 1–22.

84. Hutchinson E. C. Transport of the Influenza Virus Genome from Nucleus to Nucleus / E. C. Hutchinson, E. Fodor // *Viruses*. – 2013. – Vol. 5. – P. 2424–2446.
85. Influence of PB2 host-range determinants on the intranuclear mobility of the influenza A virus polymerase A / A. Foeglein, Eva M. Loucaides, M. Mura et al. // *Journal of General Virology*. – 2011. – Vol. 92. – P. 1650–1661.
86. Biological and structural characterization of a host-adapting aminoacid in influenza virus / S. Yamada, M. Hatta, B. L. Staker et al. // *Plos Pathogens*. – 2010. – Vol. 6 (8). – P. 1–11.
87. Substitution of lysine at 627 position in PB2 protein does not change virulence of the 2009 pandemic H1N1 virus in mice / H. Zhu, J. Wang, P. Wang et al. // *Virology*. – 2010. – Vol. 401. – P. 1–5.
88. Massin P. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses / P. Massin, S. van der Werf, N. Naffakh // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75 (11). – P. 5398–5404.
89. Salomon R. The Influenza Virus Enigma / R. Salomon, R. G. Webster // *Cell*. – 2009. – Vol. 136. – P. 402–410.
90. Tscherne D. M. Virulence determinants of pandemic influenza viruses / D. M. Tscherne, A. Garcia-Sastre // *Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Vol. 121 (1). – P. 6–13.
91. Mehle A. Adaptive strategies of the Influenza virus polymerase for replication in humans / A. Mehle, J. A. Doudna // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2009. – Vol. 106 (50). – P. 21312–21316.
92. Патогенез гриппа: механизмы модуляции белками возбудителя / М. Ю. Щелканов, А. Ф. Попов, А. И. Симакова и др. // *Журнал инфектологии*. – 2015. – Том 7 (2). – С. 31–46.
93. The Interactomes of Influenza Virus NS1 and NS2 Proteins Identify New Host Factors and Provide Insights for ADAR1 Playing a Supportive Role in Virus Replication / B. Chassey, A. Aublin-Gex, A. Ruggieri et al. // *PLOS Pathogens*. – 2013. – Vol. 9 (7). – P. 1–14.

94. New world bats harbor diverse influenza A viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al. // *Plos Pathogens*. – 2013. – Vol. 9 (10). – P. 1–12.
95. Heterosubtypic antibodies to influenza A virus have limited activity against cell-bound virus but are not impaired by strain-specific serum antibodies / A. Wyrzucki, M. Bianchi, I. Kohler et al. // *Journal of Virology*. – 2015. – Vol. 89 (6). – P. 3136–3144.
96. Ерофеева М. К. Современные проблемы гриппа и его специфической профилактики / М. К. Ерофеева, И. Ю. Никоноров // *Всероссийский журнал для врачей всех специальностей*. – 2009. – № 2 – С. 3–9.
97. Genetic and antigenic typing of seasonal influenza virus breakthrough cases from a 2008–2009 vaccine efficacy trial / S. Durvieux, J. Treanor, J. Beran et al. // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2014. – Vol. 21. – P. 271–279.
98. Virological surveillance of influenza viruses during the 2008–09, 2009–10 and 2010–11 seasons in Tunisia / A. El Moussi, F. Pozo, M. A. Ben et al. // *Plos one*. – 2013. – Vol. 8 (9). – P. 1–9.
99. Computational analysis of adaptive antigenic mutations of the human influenza hemagglutinin for vaccine strain selection / J. D. Rickert, T. A. Herpy, H. Zhong, G. Lu // *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*. – 2012. – Vol. 8 (1–2). – P. 81–98.
100. Genetic variation analysis of hemagglutinin and neuraminidase of human influenza A(H3N2) virus in Hong Kong (1997-2006) / S. Zhang, J.Y. Chen, J. Rao et al. // *African Journal of Microbiology Research*. – 2014. – Vol. 8 (18). – P. 1863–1893.
101. Genetic evolution of the neuraminidase of influenza A (H3N2) viruses from 1968 to 2009 and its correspondence to haemagglutinin evolution / Kim B. Westgeest, Miranda de Graaf, Mathieu Fourment et al. // *Journal of General Virology*. – 2012. – P. 1996–2007.
102. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin A(H1N1) influenza virus circulating in humans / R. J. Garten, C. A. Russell et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 325 – P. 197–201.

103. Stray S. J. Subtype - and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin / S. J. Stray, L. B. Pittman // *Virology Journal*. – 2012. – Vol. 9 (91). – P. 1–16.
104. Методичні рекомендації «Принципи діагностики та лікування хворих на гострі респіраторні вірусні захворювання» // *Укр. Мед. Часопис*. – 2010. – № 6 (80). – С. 24–29.
105. Грип у дітей. Сучасні підходи до діагностики та лікування / С. О. Крамарев, В. В. Євтушенко, Л. О. Палатна [та інші] // *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія*. – 2010. – № 8 (37). – С. 1–4.
106. Рекомендації для служби охорони здоров'я України щодо планування та організації заходів проти пандемічного грипу “Реагування служби охорони здоров'я України на пандемічний грип” МОЗ, ІЕІНХ АМН України ім. Л.В. Громашевського та УНДПІ ім. Мечникова за технічної підтримки РАТН, CDC, ВООЗ. 1-ше видання: Київ: РАТН. – 2009 р. – С. 136.
107. Zhang J. Isolation of swine influenza virus in cell cultures and embryonated chicken eggs / J. Zhang, P. C. Gauger // *Methods Mol Biol*. – 2014. – Vol. 1161. – P. 265–276.
108. Eisfeld A. J. Influenza A virus isolation, culture and identification / A. J. Eisfeld, G. Neumann, Y. Kawaoka // *Nature Protocols*. – 2014. – Vol. 9 (11). – P. 2663–2681.
109. Performance characteristics of qualified cell lines for isolation and propagation of influenza viruses for vaccine manufacturing / R. O. Donis, i-Mei Chen, C. T. Davis et al. // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. – P. 6583–6590.
110. Руденко А. А. Клиника, дифференциальная диагностика, лечение гриппа и других ОРВИ / А. А. Руденко // *Профілактична медицина*. – № 1 (5). – 2009. – С. 84–91.
111. Инструкция по применению иммуноглобулинов для диагностики респираторно-вирусных заболеваний (гриппа, парагриппа, РС- и аденоинфекций), Отдел новых технологий НИИЭМ имени Пастера, ООО

- "Предприятие по производству диагностических препаратов", Санкт – Петербург, Россия.
112. Швидкі тести у діагностиці деяких інфекційних захворювань та невідкладних станів у практиці сімейного лікаря / І. В. Богадельніков, А. В. Кубишкін, В. Н. Скопиченко та інші. – Симферополь-Київ: Вид. «Вперед». – 2009. – С. 69–80.
 113. Evaluation of Wondfo influenza A&B fast test based on immunochromatography assay for rapid diagnosis of influenza A H1N1 / Y. Peng, J. Wuc, X. Liub // Brazilian Journal of Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 17 (2). – P. 247–250.
 114. Наказ МОЗ України від 24.01.2008 року № 26 Про затвердження державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічно-патогенні агенти I –IV патогенності молекулярно-генетичними методами », м. Київ.
 115. Наказ МОЗ України від 04.12.2009 р. № 922 «Про організацію вірусологічних досліджень на грип та гострі респіраторні вірусні інфекції в Україні в період пандемії», м. Київ.
 116. ПЦР «в реальном времени» / Д. В. Ребриков, Г. А. Саратов, Д. Ю. Трофимов и др. [под ред. д.б.н. Д. В. Ребрикова; предисл. Л. А. Остермана и акад. РАН и РАСХН Е. Д. Свердлова]. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.
 117. Рекомендации ВОЗ по лабораторной диагностике нового вируса гриппа А (H1N1) у людей / Всемирная организация здравоохранения. – 2009. – С. 14.
 118. Muradrasoli S. Detection and quantification of variable viral RNA by real-time PCR assays / S. Muradrasoli // Acta universitatis upsalensis uppsala. – 2008. – P. 28–29.
 119. Viral infections in outpatients with medically attended acute respiratory illness during the 2012–2013 influenza season / R. K. Zimmerman, C. R. Rinaldo, M. P. Nowalk et al. // BMC Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 15. – P. 1–13.

120. Абрамсон Н. И. Молекулярная и традиционная филогенетика. На пути к взаимопониманию / Н. И. Абрамсон // Труды Зоологического института РАН. – 2013. – № 2. – С. 219–229.
121. Русаков С. В. Обзор методов филогенетической реконструкции языков / С. В. Русаков, Д. М. Нурбакова // Вестник Пермского университета. Математика. Механика. Информатика. – 2012. – № 1 (9). – С. 67–72.
122. Волков Ю. П. Анализ эффективности некоторых методов построения филогенетических деревьев, используемых при оценке эволюционного родства микроорганизмов / Ю. П. Волков, Г. А. Ерошенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – № 99. – С. 35–41.
123. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // Bioinformatics. – 2012. – P. 1–2.
124. Основные методы анализа эволюционных отношений между последовательностями генетических макромолекул / В.В. Хрусталеv, Е. В. Барковский, А. В. Бутвиловский [и др.]. – Здоровоохранение. – Минск. – 2005. – № 8. – С. 11–13.
125. Рекомендації Центру грипу в Атланті, США щодо використання в практиці вірусологічних лабораторій КК з метою виділення вірусів грипу. – 1997. – 10 с.
126. Грип та його профілактика: навчальний посібник / за ред. Дзюблик І. В., Широбокова В. П. – К., 2005. – 194 с.
127. Вирусология. Методы. [пер. с англ.] / под. ред. Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988. – 344 с.
128. Рева О. Н. Филогенетический анализ: (Краткий курс лекций). – К. : Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, 2009. – 38 с.
129. Методы молекулярной эволюции и филогенетики: учеб.-метод. пособие / Е. В. Барковский, А. В. Бутвиловский, В. Э. Бутвиловский и др. // Минск : БГМУ. – 2005. – 63 с.

130. Бутвиловский А. В. Базисные методы молекулярной эволюции: учеб.-метод. пособие / А. В. Бутвиловский, Е. В. Барковский, В. Э. Бутвиловский. – Минск: БГМУ, – 2006. – 36 с.
131. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson et al. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.
132. Felsenstein J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading / J. Felsenstein // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 1978. – Vol. 27. – P. 401–410.
133. Глотов Н. В. Биометрия / Н. В. Глотов, Л. А. Животовский, И. Н. Хромов; Под ред. Тихомировой М. М. – Л.: Изд-во Ленинградского университета. – 1982. – 264 с.
134. Boyalska O. Retrospective analysis of influenza-induced morbidity in populations of Zhytomyr region during 1999–2011 / O. Boyalska, I. Kyrychuk, A. Boyko // Матеріали VII міжнародної конференції “Біоресурси і віруси”, 10-13 вересня 2013 р. – Київ : Експрес-типографія «Глобус», 2013. – С. 27.
135. Бояльська О. Поширення вірусу грипу серед різних груп населення Житомирської області / О. Бояльська, І. Киричук // Вірусологія: минуле, сьогодні, майбутнє : матеріали конференції, присвяченої 50-річчю кафедри вірусології КНУ імені Тараса Шевченка», 12 квітня 2012 р. – Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2012. – С. 17–18.
136. Бояльська О. Г. Вірусологічний нагляд за грипом та іншими ГРВІ у Житомирській області за період 2012–2014 рр. / О. Г. Бояльська, І. М. Киричук, А. Л. Бойко // Біологічні дослідження – 2015 : V Науково-практична конференція для молодих учених і студентів, 11–12 березня 2015 р.: збірник наукових праць. – Житомир: ПП «Рута», 2015. – С. 214–216.

137. Phylogenetic analysis of influenza B viruses circulating in Zhytomyr region during 2010–2011 and 2014–2015 epidemic seasons / O. G. Boyalska, O. V. Onyschenko, L. V. Radchenko, O. Yu. Smutko // *CYS-2015 : матеріали Міжнародної конференції для молодих учених, Київ, 21–25 вересня 2015.* – Л. : Вежа-Друк, 2015. – С. 57.
138. Phylogenetic analysis of influenza viruses A (H3N2), that been circulated in Zhytomyr region during 2013–2014 epidemic season / O. G. Boyalska, I. M. Kyrychuk, O. O. Shpyta et al. // *Сучасні проблеми мікробіології та біотехнології : матеріали Міжнародної конференції для молодих учених, 1–4 червня 2015.* – Одеса : «Одеський національний університет», 2015. – С. 58–60.
139. 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 et al. // *Мікробіологія та біотехнологія .* – 2015. – № 2 (30). – С. 20–26.
140. Performance of the European region influenza surveillance network: alignment with global standarts / M. Hegermann-Lindencrone, D. Gross, T. Meerhoff et al. // *Панорама общественного здравоохранения.* – 2015. – № 1 (1). – С. 79–88.
141. Influenza. Past pandemics [website] // Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. – 2015. – Режим доступу: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/pandemic-influenza/past-pandemics>.
142. WHO Regional Office for Europe guidance for sentinel influenza surveillance in humans // World Health Organization. – 2011. – 144 с.
143. Маркович І. Г. Погляд на проблему епіднагляду за грипом та гострими респіраторними інфекціями в світі та в Україні / І. Г. Маркович // *Профілактична медицина.* – 2015. – № 1–2 (24). – С. 98–104.
144. Influenza surveillance in Europe: establishing epidemic thresholds by the moving epidemic method / T. Vega, J. E. Lozano, T. Meerhoff et al. // *Influenza Other Respiratory Viruses.* – 2013. – Vol. 7 (4). – P. 5465–5468.

145. Маркович І. Г. Аналіз захворюваності на грип населення України за 2009–2013 роки / І. Г. Маркович, О. Й. Гриневич // Україна. Здоров'я нації. – 2013. – № 2 (26). – С. 118–124.
146. Інформаційно-статистичні матеріали Державної служби статистики України за період з 1999 до 2015 рр. (Житомирській області та Україна) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://database.ukrcensus.gov.ua/MULT/Dialog/statfile_c.asp
147. Звіт про окремі інфекції та паразитарні захворювання затверджений наказом від 02.06.2009 р. № 378 МОЗ України у розрізі районів області за 1999–2015 рр. : звітні форми про захворюваність за місяць –ф.1 та рік – ф.2.
148. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere (14th - 18th February 2010) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2010. – p. 58.
149. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere (September 2010) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2010. – p. 57.
150. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere (4th - 17th February 2011) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2011. – p. 67.
151. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere (26th – 30th September 2011) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2011. – p. 74.
152. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere (20th – 22nd February 2012) //

- WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2012. – p. 70.
153. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2013 (17th – 19th September 2012) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2012. – p. 81.
 154. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2013/14 (18th – 20th February 2013) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2013. – p. 85.
 155. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2014 (23rd – 25th September 2013) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2013. – p. 112.
 156. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2015 (22nd – 24th September 2014) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2014. – P. 38–85.
 157. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2015/16 (23rd – 25th February 2015) // WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza National Institute for Medical Research. – 2015. – p. 95.
 158. Seroepidemiological studies of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus / World Health Organization, Geneva. – 2010. – № 24. – P. 229–236.
 159. Review of the 2010–2011 winter influenza season, northern hemisphere / World Health Organization, Geneva. – 2011. – № 22. – P. 222–227.
 160. Review of the 2011–2012 winter influenza season, northern hemisphere / World Health Organization, Geneva. – 2012. – № 24. – P. 233–240.
 161. Review of the 2012–2013 winter influenza season, northern hemisphere / World Health Organization, Geneva. – 2013. – № 22. – P. 225–232.

162. Review of the 2013–2014 winter influenza season, northern hemisphere / World Health Organization, Geneva. – 2014. – № 23. – P. 245–256.
163. Review of the 2014–2015 influenza season in the northern hemisphere / World Health Organization, Geneva. – 2015. – № 23. – P. 281–296.
164. Перспективи використання протівірусних препаратів у хворих на грип / А. П. Міроненко, Л. В. Радченко, О. С. Голубка, О. В. Онищенко та інші // Здоров'я України. – 2014. – № 23. – С. 3.
165. Epidemiology characteristics of respiratory viruses found in children and adults with respiratory tract infections in southern China / D. Zhang, Z. He, L. Xu et al. // International Journal of Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 25. – P. 159–164.