

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского»  
Министерства Здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**СИЛУЯНОВА ЭЛИНА ВЛАДИМИРОВНА**

**ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2)  
и В в ПЕРИОД 2003-2013 гг. в РФ.**

**03.02.02-вирусология**

**03.01.03 – молекулярная биология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание учёной степени кандидата биологических наук**

**Научные руководители:  
доктор медицинских наук  
Бурцева Е.И.  
кандидат биологических наук  
Альховский С.В.**

Москва-2014

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	7
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	9
<b>РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	16
<i><b>ГЛАВА 1. Классификация и строение вируса гриппа</b></i> .....	16
1.1 Структура вириона вируса гриппа.....	17
<i><b>ГЛАВА 2. Характеристика вируса гриппа А(Н3N2)</b></i> .....	20
2.1 История вируса гриппа А(Н3N2).....	20
2.2. Антигенная характеристика вируса гриппа А(Н3N2) в период с 2003 по 2013 гг, циркулировавших в мире.....	22
2.3. Антигенная характеристика вируса гриппа А(Н3N2) в период с 2003 по 2013 гг, циркулировавших в РФ.....	24
2.4. Молекулярно-генетическое строение НА, NA и М-белка вируса гриппа А(Н3N2).....	25
2.4.1. Структура белка НА.....	25
2.4.2. Структура белка NA.....	27
2.4.3. Структура М-белка.....	29
2.5. Изменения в последовательностях НА и их влияние на свойства штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в мире с 2003 по 2013 гг.....	30
2.6. Изменения в последовательностях НА и их влияние на свойства штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в России с 2006 по 2012 гг.....	34
2.7. Изменения в последовательностях NA и их влияние на свойства вирусов гриппа А(Н3N2), циркулирующих с 2003 по 2013 гг. в мире.....	38
2.8. Замены в последовательностях белка нейраминидазы, связанные с резистентностью к лекарственным препаратам.....	39
2.9. Изменения в последовательностях М-белка и их влияние на свойства вирусов гриппа А(Н3N2).....	40
<i><b>ГЛАВА 3. Характеристика вируса гриппа В</b></i> .....	43
3.1 История вируса гриппа В.....	43
3.2 Антигенная характеристика штаммов вируса гриппа В,	

циркулирующего в мире в период 2003 - 2013 гг.....	46
3.3. Антигенная характеристика штаммов вируса гриппа В, циркулирующих в России в период 2003 - 2013 гг.....	48
3.4. Молекулярно-генетическое строение HA и NA вирусов гриппа В.....	49
3.4.1 Структура белка HA.....	49
3.4.2. Структура NA.....	50
3.5. Изменения в последовательностях HA и их влияние на свойства вирусов гриппа В, циркулировавших в мире в период 2003-2013.....	51
3.6. Изменения в последовательностях HA и их влияние на свойства вирусов гриппа В, циркулировавших в РФ в период 2003-2013.....	53
3.7. Изменения в последовательностях NA и их влияние на свойства вирусов гриппа В.....	58
3.7.1. Замены в последовательностях белка нейраминидазы вируса гриппа В, связанные с резистентностью к лекарственным препаратам.....	60
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	61
<b>РАЗДЕЛ 2. Результаты собственных исследований</b> .....	64
<b>ГЛАВА 1. Материалы и методы</b> .....	64
1.1 Эпидемические штаммы вирусов гриппа.....	64
1.2 Методы изучения антигенных свойств штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и В.....	66
1.2.1 Изоляция эпидемических штаммов вирусов гриппа.....	66
1.2.2. Изучение антигенных свойств вирусов гриппа.....	66
1.3 Методы изучения молекулярно-генетических свойств эпидемических штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В.....	67
1.3.1. Выделение вирусной РНК из исследуемого материала.....	67
1.3.2. Обратная транскрипция.....	68
1.3.3. Тест-системы для детекции вирусов гриппа А(Н3N2) и В методом ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).....	68
1.3.4. Тест-системы для определения принадлежности штаммов вируса гриппа В к эволюционным линиям.....	68

1.3.5. Модифицирование лабораторного варианта тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий гриппа В .....	69
1.3.6. Пробоподготовка.....	69
1.3.7. Определение нуклеотидных последовательностей генов НА, NA, М.....	70
1.3.8. Построение филогенетических дендрограмм.....	71
<b>ГЛАВА 2. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа</b>	
<b><i>A(H3N2) циркулировавших на территории России с 2003 по 2013 гг.....</i></b>	<b>71</b>
2.1 Активность вируса гриппа А(H3N2) как этиологического агента эпидемических подъемов заболеваемости в период 2009-2013гг. и его антигенные свойства.....	71
2.2. Характеристика штаммов вируса гриппа А(H3N2), выделенных на отдельных территориях РФ в 2003-2013гг. и отобранных для проведения молекулярно-генетического анализа.....	73
2.3 Молекулярно-генетический анализ гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2).....	76
2.3.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2).....	76
2.3.2 Анализ аминокислотной последовательности гемагглютинаина эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2), циркулировавших в 2003-2013гг.....	79
2.3.3 Филогенетический анализ последовательностей гемагглютинаина эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.....	83
2.4 Молекулярно-генетический анализ гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2).....	87
2.4.1 Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2).....	87

2.4.2 Анализ аминокислотной последовательности белка нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.....	88
2.4.3 Филогенетический анализ последовательностей нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.....	93
2.5. Молекулярно-генетический анализ гена белка М эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2).....	96
2.5.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена белка М эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2).....	96
2.5.2 Анализ аминокислотной последовательности белка М эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2).....	97
2.5.3 Филогенетический анализ последовательностей белка М эпидемических штаммов вируса гриппа А(H3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.....	98
<b>ГЛАВА 3. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших на территории России с 2003 по 2013 гг.....</b>	<b>101</b>
3.1. Активность вируса гриппа В как этиологического агента эпидемических подъемов заболеваемости в период 2009-2013гг. и его антигенные свойства.....	101
3.2. Характеристика штаммов вируса гриппа В выделенных на отдельных территориях РФ в 2003-2013гг. и отобранных для проведения молекулярно-генетического анализа.....	103
3.3. Молекулярно-генетический анализ гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа В.....	106
3.3.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа В.....	106
3.3.2. Анализ аминокислотной последовательности	

гемагглютини́на эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В, циркулировавших в 2003-2013гг.....	108
3.3.3 Филогенетический анализ последовательностей гемагглютини́на эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В/Ямагатской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.....	111
3.3.4. Филогенетический анализ последовательностей гемагглютини́на эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В/Викторианской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.....	114
3.4. Молекулярно-генетический анализ гена NA эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В.....	116
3.4.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена NA эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В.....	116
3.4.2. Анализ аминокислотной последовательности нейраминидазы эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В, циркулировавших в 2003-2013гг.....	117
3.4.3. Филогенетический анализ последовательностей нейраминидазы эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В/Ямагатской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.....	121
3.4.4. Филогенетический анализ последовательностей нейраминидазы эпидеми́ческих штаммов вируса гриппа В/Викторианской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.....	123
<b>3.5. Модификация лабораторного варианта тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий гриппа В.....</b>	<b>125</b>
<b>ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>132</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>146</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>147</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток  
 ВОЗ (WHO) – Всемирная Организация Здравоохранения  
 ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота  
 к-ДНК – комплиментарная ДНК  
 н.о. – нуклеотидный остаток  
 ОТ-ПЦР - ПЦР с обратной транскрипцией  
 ОТ-ПЦР-РВ - ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени  
 РТГА - реакция торможения гемагглютинации  
 ПЦР – полимеразно - цепная реакция  
 РНК - рибонуклеиновая кислота  
 ЦЭЭГ – центр экологии и эпидемиологии гриппа  
 М2- мембранный белок вируса гриппа В  
 М2 - мембранный белок вируса гриппа С  
 CDC&P- Центр по контролю за заболеваемостью и профилактики  
 FAM- 6-карбоксифлуоресцин  
 HA - гемагглютинин  
 HA1 – субмолекула гемагглютинина  
 HA2- субмолекула гемагглютинина  
 H1- гемагглютинина первого типа  
 H3- гемагглютинина третьего типа  
 HEX - флуорохром  
 IBH<sub>Ygr</sub> – зонд для вирусов гриппа В В/Ямагатской линии  
 IBH<sub>Vgr</sub> – зонд для вирусов гриппа В В/Викторианской линии  
 M1 – матричный белок  
 M2 – мембранный белок  
 MDCK – перевиваемая линия ткани почки собак культура клеток (Madin-Darby Canine Kidney)  
 MMLV – обратная транскриптаза NIMR – Национальный институт Медицинских Исследований (Лондон)  
 NA - нейраминидаза  
 NP- нуклеопротеидный белок  
 NS1 и NS2 – неструктурные белки  
 NB-трансмембранный гликопротеид вируса гриппа В  
 N2 –нейраминидаза второго типа  
 PB1 и PB2 – полимеразные белки

### Список нуклеиновых оснований:

Сокращение		полное название
английское	русское	
A	А	Аденин
G	Г	Гуанин
C	Ц	Цитозин
T	Т	Тимин
U	У	Урацил

## Список аминокислот

Аминокислота	Сокращение		
	русское	английское	однобуквенный код
Глицин	Гли	Gly	G
Аланин	Ала	Ala	A
Валин	Вал	Val	V
Лейцин	Лей	Leu	L
Изолейцин	Иле	Ile	I
Пролин	Про	Pro	P
Фенилаланин	Фен	Phe	F
Тирозин	Тир	Tyr	Y
Триптофан	Трп	Trp	W
Серин	Сер	Ser	S
Треонин	Тре	Thr	T
Аспарагиновая кислота	Асп	Asp	D
Глутаминовая кислота	Глу	Glu	E
Аспарагин	Асн	Asn	N
Глутамин	Глн	Gln	Q
Цистеин	Цис	Cys	C
Метионин	Мет	Met	M
Гистидин	Гис	His	H
Лизин	Лиз	Lys	K
Аргинин	Арг	Arg	R

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Грипп и другие респираторные вирусные инфекции остаются одними из самых актуальных медицинских и социально-экономических проблем. В России ежегодно регистрируют от 26 до 34 миллионов случаев острых респираторных вирусных инфекций, при этом грипп занимает в структуре ОРВИ до 5-10%. В отличие от других возбудителей ОРВИ вирусы гриппа А и В практически ежегодно вызывают эпидемические подъемы заболевания, а для вирусов гриппа А известны пандемические формы распространения.

Изучение молекулярной эволюции вирусов гриппа предоставляет важную информацию по их генезису и особенностям распространения в разных странах мира. Вирус гриппа А(Н3N2) начал циркулировать среди людей с 1968 года, вызвав пандемию «гонконского гриппа» и продолжает оставаться одним из доминирующих в этиологии эпидемий последнего десятилетия. Исследования филогенетических дендрограмм домена HA1 гемагглютинина подтипа Н3 показали, что эволюционная изменчивость вируса гриппа А(Н3N2) была представлена в виде кактус - подобной структуры, в которой большинство генетических линий исчезает в течение нескольких лет их циркуляции и только одна линия продолжает существовать между эпидемиями (Smith et al., 2004, Ghedin E., 2005). Интересным является факт появления вирусов подобных эталонному штамму А/Фуцзян/411/02 в сезоне 2003-2004, в следствие так называемого «прыжка» в эволюции вирусов А(Н3N2), которые стали причиной значительной эпидемии и полностью вытеснили социркулирующие с ними вирусы гриппа А(Н1N1) и В (Chi S.X., 2005, Barr I.G., 2005). Такой результат, вероятнее всего, оказался последствием селекционного давления, происходящего в результате непрекращающейся эволюции в ключевых антигенных сайтах (антигенный дрейф) (Lin Y.P., 2004).

Вирусы гриппа В также представляют определённый интерес, т.к. являются активными участниками многих эпидемических процессов. С 1988 г.

произошло «раздвоение» популяции вируса гриппа В на две антигенно различные ветви - В/Виктория/2/87-подобные и В/Ямагата/16/88-подобные. С тех пор вирус гриппа В эволюционирует двумя социркулирующими эволюционными линиями (Kanegae Y. et al., 1990; Rota P.A., 1990). До 2001 г. преимущественное распространение в мире получили штаммы, подобные В/Ямагата/16/88, между тем как В/Виктория/2/87- подобных представителей детектировали только на территории Юго-Восточной Азии (Chen R., 2008). С 2001 г. стали регистрировать совместную циркуляцию двух эволюционных линий, что привело к формированию реассортантов между ними, которые циркулировали во всем мире в период с 2002 по 2005 гг. (Matsuzaki Y., 2004, McCullers J., 2004).

Ежегодно вирусы гриппа вызывают эпидемии в обход уже существующему иммунитету благодаря постоянной мутационной изменчивости (антигенный дрейф) в гемагглютинине (НА), т.к. он является основной целью для антител, а также изменениям в НА и М-белке, связанных с чувствительностью к противовирусным препаратам. Поэтому большинство исследований молекулярно-генетического строения НА, НА и М-белка посвящено их эволюционным изменениям, в результате появления новых значимых мутаций.

С 1959 г. на ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ возложены функции одного из Национальных центров по гриппу, сотрудничающих с ВОЗ. В связи с этим, основными направлениями научно-практической деятельности центра являются: мониторинг циркуляции вирусов гриппа в России, изучение антигенных, биологических и молекулярно-генетических свойств. Проводимые нами молекулярно-генетические исследования циркулирующих в России вирусов гриппа являются неотъемлемой частью мониторинга гриппа в мире и используются ВОЗ при формировании состава гриппозных вакцин и рекомендаций по применению противовирусных препаратов.

В связи с вышесказанным, целью исследования было изучение молекулярно-генетических характеристик и особенностей эволюционной

изменчивости вирусов гриппа А(Н3N2) и В, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в период 2003-2013гг. в России.

### **Цели и задачи исследования**

Для достижения **цели** были поставлены **следующие задачи**:

1. Определить долевое участие вирусов гриппа А(Н3N2) и В в период эпидемических подъемов заболеваемости 2009-2013гг.
2. Подобрать репрезентативную выборку штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, циркулировавших в РФ в период 2003-2013гг., для изучения их эволюционной изменчивости.
3. Разработать протоколы секвенирования генов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, кодирующих НА, NA и М-белок. С использованием разработанных протоколов получить геномные данные для изучаемых штаммов.
4. Модифицировать и адаптировать лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий вируса гриппа В, с учётом особенностей циркулирующих в настоящее время штаммов.
5. На основе анализа полученных нуклеотидных последовательностей эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и В, идентифицировать в NA и М2-белке мутации, ответственных за устойчивость к противовирусным препаратам.
6. На основе полученных данных провести филогенетический анализ исследуемых штаммов вируса гриппа А (Н3N2) и В.

### **Научная новизна**

1. Определено долевое участие вирусов гриппа А(Н3N2) и В в этиологии эпидемических подъемов заболеваемости в период 2009-2013гг., особенности их антигенных, биологических и молекулярно-генетических свойств, направления

эволюционной изменчивости в период 2003-2013гг. в РФ.

2. С использованием разработанных протоколов для секвенирования полноразмерных генов, кодирующих HA, NA и M-белок, определены молекулярно-генетические характеристики изучаемых штаммов.

3. Определены специфические замены в последовательностях HA (T10M, Q57H, V182I) и NA (P154S, T434N) штаммов вируса гриппа A(H3N2), характерные только для российских штаммов.

4. Модифицирован лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации двух эволюционных линий вируса гриппа В (В/Виктория-подобных и В/Ямагата-подобных) с использованием двух специфических зондов IBHYpr и IBHVpr, меченных красителями FAM и HEX.

5. Составлены сравнительные филогенетические дендрограммы последовательностей HA, NA и M-белка штаммов вирусов гриппа A(H3N2) и В, выделенных на территории РФ и в других странах мира, в том числе рекомендованных экспертами ВОЗ в качестве эталонных.

#### **Научно-практическая значимость работы.**

Сопоставление результатов изучения антигенных, биологических и молекулярно-генетических свойств циркулировавших на территории РФ в период 2003-2013гг. штаммов вирусов гриппа A(H3N2) и В позволили выявить особенности их эволюционной изменчивости, в частности, соответствие свойствам вакцинных штаммов и чувствительность к противовирусным препаратам. Полученные данные молекулярно-генетического анализа являлись основанием для замены вакцинных штаммов и рекомендацией к использованию антивирусных препаратов.

Модифицирован лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени с использованием двух зондов (IBHYpr и IBHVpr) для дифференциации эволюционных линий вирусов гриппа В, что позволило уточнить доленое участие штаммов вирусов гриппа В в эпидпроцессе.

Разработка протоколов секвенирования полноразмерных генов, кодирующих NA и M, позволили получить данные о частоте встречаемости специфических мутаций, ответственных за устойчивость к противовирусным препаратам – озельтамивиру и ремантадину. Данные о генетических маркёрах чувствительности к противовирусным препаратам были представлены на сайт Европейского Регионального Бюро ВОЗ (<http://www.euro.who.int>).

Полноразмерные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA) и матриксный белок (M) штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) были депонированы в базу GenBank (JQ988024-JQ988050).

В период 2009-2013гг. 39 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и 59 штаммов вируса гриппа В были переданы в два Международных центра по гриппу, сотрудничающих с ВОЗ - Национальный Институт по медицинским исследованиям (NIMR), Лондон, Великобритания и Отдел гриппа Центров по контролю за заболеваемостью и профилактике (CDC&P). Атланта, США для включения в международный мониторинг и выработке рекомендаций по составу гриппозных вакцин.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Появление в 2009г. в активной циркуляции пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 изменило долевое участие штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В в эпидемическом процессе в РФ: А(Н3N2) был не активен в сезоне 2009-2010гг. и доминировал только в одном из последних четырех сезонов (2012-2013гг.); штаммы вируса гриппа В, вызвавшие вторую волну подъема заболеваемости зимой 2010г., циркулировали в последующие сезоны с долевым участием от 17% до 47%.
2. Популяция циркулировавших штаммов вируса гриппа В в период 2009-2013гг. была гетерогенна и представлена штаммами обеих эволюционных линий, причем штаммы линии В/Виктория-подобных были активными в трёх из четырех последних сезонов (исключение составил сезон 2012-2013гг.).

3. Эволюция вирусов гриппа А(Н3N2) и В в РФ в 2003-2013гг. шла в направлении, сравнимом с особенностями изменчивости этих вирусов в мире в целом.

4. Разработанные протоколы для секвенирования позволяют получать полноразмерные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих НА, NA и М-белок эпидемических штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, что необходимо для проведения молекулярно-генетического анализа в отношении них, с целью выявить значимые аминокислотные замены.

5. Модифицированный лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий вирусов гриппа В позволяет в короткие сроки установить принадлежность штаммов вируса гриппа В к той или иной линии, что повышает уровень мониторинга вируса гриппа В в России.

**Личный вклад** автора состоит в выполнении исследований по ПЦР-диагностики гриппа в клиническом материале, участию в изучении антигенных свойств эпидемических штаммов вирусов, молекулярно-генетическому анализу последовательностей молекул гемагглютинина, нейраминидазы и М-белка, построению филогенетических дендрограмм. Все материалы, представленные в диссертационной работе, были изучены и проанализированы автором.

#### **Внедрение результатов работы.**

Все исследования соответствовали плановым научным тематикам лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России: тема №1 «Новые и возвращающиеся вирусные инфекции в системе биобезопасности: эволюция новых (высоковирулентный вирус H5N1, новый пандемический вирус H1N1pdm09) и сезонных вирусов гриппа рода Orthomyxoviridae и других вирусов. Сохранение и пополнение Государственной коллекции вирусов», тема № 6 «Разработка и оценка новых противовирусных препаратов» лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа, тема № 7 «Молекулярная медицина: фундаментальные и

прикладные аспекты» и были поддержаны международными грантами «Укрепление и совершенствование надзора за гриппом с разработкой ответных мероприятий» (Договор № 5U51P000527-02, заключенный между ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и Центрами по контролю за заболеваемостью и профилактике, Атланта, США (Centers for Diseases Control and Prevention, CDC&P, Atlanta, USA)) и « Глобальная госпитальная сеть эпидемиологического надзора за гриппом» (FLU-22-EXT Санофи Пастер, Леон, Франция).

#### **Апробация результатов исследования.**

Результаты работ были представлены на международных симпозиумах и конференциях: International Conference ISIRV Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management (Hanoi, Vietnam, 2012); X и XI Научно-практической конференции «Инфекционные болезни и антимикробные средства», Москва, 2012, 2013; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013», Москва, 2013; International Conference Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, South Africa, 2013; XII Конгресс детских инфекционистов России, Москва, 2013.

#### **Публикации.**

По результатам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 статей в журналах реферируемых ВАК, 10 тезисов.

#### **Структура и объём диссертации.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, их обсуждения и выводов. Список литературы включает 212 источников, состоящий из 25 работ отечественных и 187 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, включая 20 таблиц и 14 рисунков.

## РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### *ГЛАВА 1. Классификация и строение вируса гриппа.*

Семейство Orthomyxoviridae включает 5 родов, три из которых составляют вирусы гриппа А, В и С (роды Influenza A virus, Influenza B virus, Influenza C virus соответственно); четвертый представлен арбовирусами (Thogotovirus); пятый - вирусом инфекционной септицемии лососевых рыб (Isavirus) (Trans R., 1989, Markussen T., 2013).

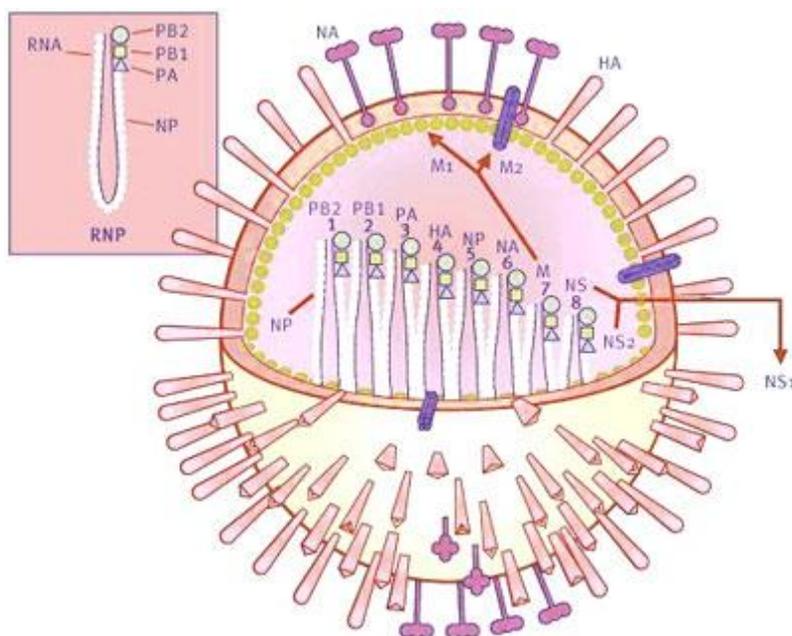
Первый вирус гриппа человека был выделен в 1933 г. В.Смитом, К.Эндрюсом и П.Лэйдоу (штамм WS) при инфицировании белых хорьков. (Laver G., 2001). Позже этот вирус был отнесен к типу А. В 1940 г. Т.Френсис и Т.Меджилл открыли вирус гриппа типа В, а в 1949 г. Р.Тэйлор - вирус гриппа типа С (Nicholson K.G. et al. 2003.). Вирусы гриппа А поражают свиней, птиц, лошадей, описаны вспышки у тюленей, норок, верблюдов, также они были обнаружены у китообразных и летучих мышей. Водоплавающие птицы являются главным природным резервуаром вирусов гриппа А, их главной эволюционной нишей (Нау А., 2001). У человека вирусы гриппа А вызывают не только сезонные эпидемии, при которых болеют миллионы людей, а гибнут десятки тысяч, но и глобальные пандемии, охватывающие весь земной шар и случающиеся с интервалом 10-40 лет.

Вирусы гриппа быстро эволюционируют и их белки весьма вариабельны. Особенно высокой вариабельностью отличаются поверхностные гликопротеины, гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA) (Сморозинцев А.А., 1984). У вируса гриппа А описаны 17 антигенных подтипов НА (Н1-Н17). Последний из открытых подтипов, Н17, был обнаружен у растительноядных летучих мышей в Центральной Америке.(Sun X., 2013) У того же вируса выявлен новый подтип NA, отдалённо родственный описанным ранее 9 подтипам NA (García-Sastre A.,2009). Лишь три подтипа вирусов гриппа А способны инфицировать человека: А(Н1N1), А(Н2N2) и А(Н3N2) (Slepshkin V., 2001)

Вирус гриппа В поражает человека и морских котиков (Osterhaus A., 2001).

У человека вирус гриппа В вызывает лишь сезонные эпидемические вспышки, хотя и не каждый год. Вирус гриппа С поражает только человека и вызывает небольшие вспышки лёгких инфекционных заболеваний (Taubenberger J., 2008)

### 1.1 Структура вириона вируса гриппа.



**Рис.1. Структура вируса гриппа.**

Оболочечный вирион вирусов гриппа А и В сферической формы диаметром около 100 нм. Вирусные частицы имеют в своём составе порядка 1% РНК, 70% протеинов, 20% липидов и 5-10% углеводов (Bouvier N., 2008). Частица заключена в липопротеиновую оболочку. Три вирусных белка (у вируса гриппа В - четыре) пронизывают липидный слой и образуют внешнюю поверхность вириона. Два из них – вирусные гликопротеины HA и NA. Они образуют поверхность вирусной частицы. Функция HA состоит в прикреплении вируса к поверхности клетки и он же производит слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной, что позволяет вирусному генетическому материалу проникнуть в клетку и инициировать инфекцию (Gao Q., 2008).

NA – это фермент, который отщепляет сиаловую (нейраминовою) кислоту, концевой сахарный остаток олигосахаридов, присутствующих в гликопротеинах и гликолипидах клеток млекопитающих и птиц. Сиаловая кислота является

рецептором для НА вирусов гриппа А и В, и её устранение необходимо для предотвращения склеивания вирусных частиц друг с другом и для успешного распространения вируса от клетки к клетке. Характер связи между сиаловой кислотой и галактозой определяет видовую и тканевую специфичность клеточных рецепторов и ограничивает круг хозяев разных вариантов вируса гриппа А (Жданов В.М., 1986, Varghese J., 1992, Corfield A. et al, 1982). Именно против НА и NA направлен антивирусный иммунитет.

Геном вирусов гриппа представлен однонитевой РНК негативной полярности («минус»-РНК), комплементарной по отношению к мРНК для вирусных белков, и представлен восемью сегментами, которые имеют почти одинаковые небольшие участки на 3'-конце (у вирусов гриппа А-12 н.о.) и частично комплементарные им одинаковые участки на 5'-конце (у вируса гриппа А -13 нуклеотидов). Эти участки полностью консервативны у разных вариантов вируса в пределах рода. У вируса гриппа С не 8, а лишь 7 РНК-сегментов. Самые большие геномные РНК-сегменты (первый и второй) кодируют полимеразные белки PB1 и PB2. Размеры этих двух сегментов у вируса гриппа А одинаковы (2341 н.о.). Третий сегмент (2233 н.о) кодирует белок PA, размер которого составляет 716 а.о. (Clancy S., 2008).

Четвёртый сегмент кодирует НА. Размеры 4-го сегмента у вирусов гриппа А сильно варьируют (1742-1778 н.о.). Размеры самого НА варьируют в несколько меньшей степени (562-566 а.о.). Молекула НА синтезируется как единая полипептидная цепь, которая в дальнейшем подвергается процессингу. Последний включает гликозилирование, сульфатирование, ацилирование (присоединение остатка жирной кислоты), отщепление сигнального пептида протеолитическое расщепление на 2 субъединицы, большую (НА1, 319-326 а.о.) и малую (НА2, 221-222 а.о.). Субъединицы в зрелой молекуле НА связаны дисульфидной связью. Расщепление необходимо для приобретения гемагглютинином функции слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной. (Wiley D., 2008). У вируса гриппа С в оболочке присутствует только один гликопротеин, HE, совмещающий функции гемагглютинина и ацетилэстеразы

(Gao Q. et al., 2008). Эстеразная функция у вируса гриппа С играет ту же роль, что функция NA у вирусов гриппа А и В, поскольку ацетилэстераза устраняет один из остатков уксусной кислоты в молекуле диацетилнейраминовой кислоты и этим разрушает клеточный рецептор вируса гриппа С (Margaret H., 2009).

Пятый сегмент РНК вируса гриппа А имеет длину 1565 н.о. Он кодирует белок NP (498 аминокислот). NP не имеет кластеров основных аминокислот, но многие его регионы способны связываться с РНК (Portela A. et al., 2002).

Шестой сегмент кодирует белок NA. Белок гликозилирован, как и HA, но не подвергается протеолитическому расщеплению. В зрелом виде белок NA представлен “грибообразным” тетрамером, содержащим две пары молекул NA. В каждой паре молекулы NA соединены дисульфидной связью. В дистальной части тетрамера расположен активный центр нейраминидазы. У вирусов гриппа В 6-й сегмент имеет дополнительную рамку считывания длиной 100 аминокислот, кодирующую трансмембранный гликопротеид NB, обладающий функцией транспорта ионов (Garman E., 2005).

Седьмой сегмент вируса гриппа А содержащий 1027 н.о. кодирует белки M1 и M2 (Gómez-Puertas P., 2000). В вирионе белок M1 образует внутренний слой оболочки, подстилая липидной слой. Белок M2 образует тетрамер, в котором центральная трансмембранная часть формирует канал, служащий для транспорта ионов водорода внутрь вирусной частицы, что является необходимым условием для отделения нуклеокапсида от белка M1 при проникновении вирусного генома в клетку. У вируса гриппа В эту функцию выполняет белок BM2, сходный с белком M2 вируса гриппа А по функции и по общему характеру структуры. У вируса гриппа С аналог белка M2 называется CM2 (Sha B., 1997).

Восьмой сегмент, самый короткий (890 н.о. у вируса гриппа А), кодирует белки NS1 и NS2. Белок NS1 необходим вирусу для противодействия антивирусному эффекту ИФН и других ИЛ. Белки NS1 и NS2 долгое время считались неструктурными, но сейчас известно, что в вирусной частице содержится несколько десятков молекул NS2. Поэтому в последнее время этот белок чаще называют NEP.

## **ГЛАВА 2. Характеристика вируса гриппа А(Н3N2).**

### **2.1 История вируса гриппа А(Н3N2).**

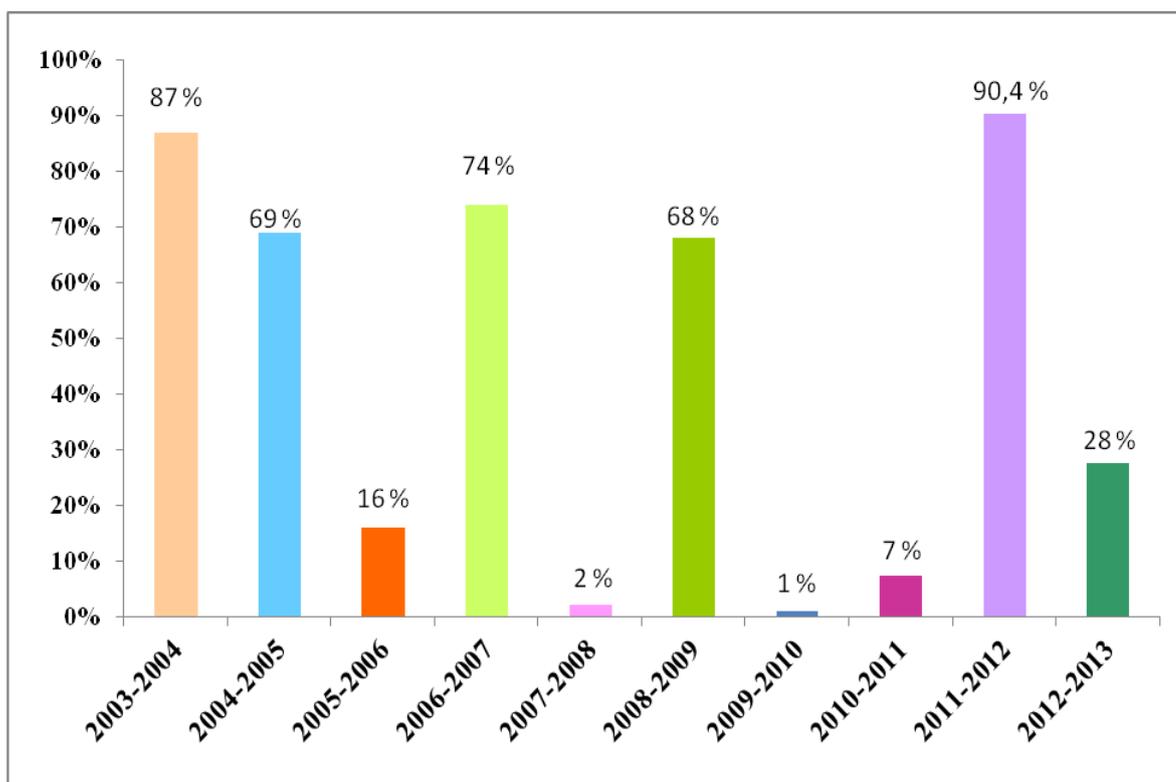
Летом 1968 г. возникла значительная эпидемия гриппа в Китае, особенно в Гонконге, где вызвала около 500 тыс. заболеваний. С помощью методов лабораторной диагностики удалось установить, что этиологическим агентом этой эпидемии является отличный от ранее циркулировавших вирусов гриппа («испанки» и «азиатского») штамм, который был определен по антигенной структуре как А(Н3N2). Эталонным вариантом был признан вирус гриппа А/Гонконг/1/68, выделенный 17 июля 1968 г. в Гонконге (Сморозинцев А.А., 1984). Эпидемия распространялась, в отличие от предыдущих, не так активно и только в течение года охватила все страны мира, приобретя статус новой пандемии, получившей название «гонконгской». По тяжести вызываемых клинических форм заболеваемости пандемия была самой легкой. В течение первого года высокая смертность была зарегистрирована только в США, где число летальных исходов составило 33 800 случаев.

В СССР активная циркуляция этого вируса была отмечена в январе-апреле 1969 г. Ряд исследователей отмечают и некоторые особенности этой пандемии (Гендон Ю., 2008). Пандемический вирус был способен инфицировать свиней, лошадей, а также птиц (куры, утки), обладая, таким образом, пантропизмом. Кроме того, вирус имел высокие потенции к изменчивости, что, по-видимому, определило длительный период его циркуляции в качестве этиологического агента последующих эпидемий вплоть до настоящего времени.

«Гонконгский грипп» был вызван новым подтипом вируса гриппа А(Н3N2), который возник в результате реассортации генов вируса гриппа человека и вируса гриппа птиц. Он наследовал НА и РВ1 от птичьего вируса, а NA и 5 других генов – от вируса гриппа А(Н2N2), циркулировавшего в предшествующие 11 лет (Starling A., 2006, Coleman M., 1968). Филогенетические исследования показали, что «птичьи» вирусные гены пандемического варианта произошли от вирусов гриппа птиц евразийской линии (Holmes E., 2005).

Как уже упоминалось выше, вирус гриппа А(Н3N2) вызвал значительную пандемию среди людей с 1968 г. и до настоящего времени является наиболее частой причиной зимне-весенних подъемов заболеваемости в России: из 45 эпидемических сезонов после 1968г., 26 - были обусловлены его доминированием в эпидемиях гриппа.

По сообщению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) вирус гриппа А(Н3N2) за последние десять лет (2003-2013 гг.) доминировал в этиологии эпидемий в пяти сезонах: в 2003-2004 гг. их долевое участие составляло 87%, в 2004-2005 — 69%, в 2006-2007 гг. - 74%, в 2008-2009 - 68%, 2011-2012 - 90,4% (рис.2). В эпидемическом сезоне 2005-2006гг. на их долю пришлось 16%, а сезоне 2012-2013 27,5%. В остальные три сезона вирусы гриппа А(Н3N2) встречались лишь в отдельных случаях – в 2007-2008 их констатировали в 2% случаях, в 2009-2010 в 1%, в 2010-2011 в 7,3% (WHO, 2003-2013).



**Рис.2 Распространение вируса гриппа А(Н3N2) в мире с 2003-2013 гг.**

За этот период вирус гриппа А(Н3N2) изменил свои свойства и полностью утратил антигенное сходство с родоначальником пандемического цикла –

эталонном А/Гонконг/1/68. Антигенная изменчивость вирусов гриппа А(Н3N2) имела линейный, поступательный характер, и каждый последующий вариант сохранял свойства предыдущего. В частности, в 2003-2004 вирус гриппа А(Н3N2) стал причиной необычно тяжёлого эпидемического сезона. Это было связано со случаями реассортации генов НА между антигенными вариантами вируса А(Н3N2), что привело к образованию доминантных вирусов, подобных новому эталонному штамму А/Фудзянь/411/2002 (Н3N2) (Ghedin E., 2005).

Анализ спектра антигенных вариантов вируса гриппа А(Н3N2), имевших эпидемическую значимость в последние годы, а также рекомендованные ВОЗ вакцинные штаммы (2003-2014гг.), представленные в табл.1, иллюстрируют гетерогенность антигенных свойств гемагглютинина циркулирующих штаммов не только в пределах одного эпидемического сезона, но также сохранение ее на протяжении последующих 2-4 лет.

Таблица 1

**Антигенный дрейф вируса гриппа А(Н3N2) с 2003-2013 гг.**

Эпидемический сезон	Рекомендации ВОЗ по вакцинному штамму	Антигенные варианты вируса гриппа А(Н3N2)
2003-2004	А/Москва/10/99	А/Фуцзянь/411/02, дрейфовые варианты
2004-2005	А/Калифорния/7/04	А/Калифорния/7/04
2005-2006		А/Калифорния/7/04, дрейфовые варианты
2006-2007	А/Висконсин/67/05	А/Висконсин/67/05
2007-2008		А/Висконсин/67/05, дрейфовые варианты
2008-2009	А/Брисбен/10/2007	А/Брисбен/10/2007, дрейфовые варианты
2009-2010		Не циркулировал
2010-2011	А/Перт/16/2010	А/Перт/16/2010
2011-2012		А/Перт/16/2010, дрейфовые варианты
2012-2013	А/Виктория/361/2011	А/Виктория/361/2011

**2.2. Антигенная характеристика вируса гриппа А(Н3N2) в период с 2003 по 2013 гг., циркулировавших в мире.**

Большинство вирусов гриппа А(Н3N2), которые циркулировали в 2003-2004

гг. были антигенно близки вакцинному штамму А/Фуцзянь/411/2002. Изоляты, полученные во второй половине эпидемического сезона были антигенно более близки штамму А/Велингтон/1/2004 (WHO, 2003-2004, Гендон Ю., 2004).

В следующем сезоне 2004-2005 большинство вирусов показали близкое антигенное родство референс штаммам А/Шантоу/1219/2004 и А/Осло/807/2004 (штаммы подобные эталону А/Фуцзянь/411/02) (WHO, 2004-2005).

Большинство вирусов гриппа А(Н3N2) 2005-2007 гг. антигенно были близки двум референсным штаммам А/Гонконг/4443/2005 и А/ Аннеси/1138/2005 (WHO, 2005-2007).

Некоторые вирусы гриппа А(Н3N2) эпидемического сезона 2007-2008 гг. были антигенно близкородственны вакцинным штаммам А/Висконсин/67/2005 и А/Хирошима/52/2005, но многие из них давали низкие титры с антисывороткой к вакцинным штаммам (WHO, 2007-2008).

В эпидемическом сезоне 2008-2009 гг. в популяции циркулировавших штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) наметились изменения по антигенным свойствам: большинство вирусов было антигенно близкородственны вакцинным штаммам А/Брисбан/10/2007 и А/Уругвай/716/2007 (Russell С., 2008). Среди вирусов гриппа был отмечен рост штаммов, которые не были способны агглютинировать эритроциты человека и индейки, но могли агглютинировать эритроциты морской свинки (WHO, 2008-2009).

Подавляющее большинство вирусов гриппа А(Н3N2) 2009-2010 гг. по антигенным свойствам были схожи с А/Перт/16/2009, вирусом рекомендованным для включения в вакцину Южного полушария в 2010 году (WHO, 2009-2010). Большинство вирусов гриппа А(Н3N2) 2010-2011 гг. показывали высокие титры в РТГА с антисыворотками, полученными против А/Виктория/208/2009 (WHO, 2010-2011).

Примерно 75% вирусов 2011-2012 гг. показали низкую реактивность с антисывороткой, полученной против вакцинного штамма А/Перт/16/2009. Большинство вирусов показывали более высокие титры с антисыворотками, полученными против А/Алабама/5/2010, А/Гонконг/3969/2011,

А/Стокгольм/18/2011 (А/Виктория/209 – подобные вирусы) (WHO, 2011-2012).

Только 5% вирусов 2012-2013 гг., выращенных на клетках MDCK-SIAT1 реагировали с антисывороткой, полученной против вируса А/Виктория/361/2011, выращенного на куриных эмбрионах (WHO, 2012-2013). Большинство штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) лучше взаимодействовали с антисывороткой, полученной против нового эталонного штамма А/Техас/50/2012, выращенного на куриных эмбрионах.

### **2.3. Антигенная характеристика вируса гриппа А(Н3N2) в период с 2003 по 2013 гг., циркулирующих в РФ.**

Антигенный анализ вирусов гриппа А(Н3N2) 2003-2004 гг., циркулирующих на территории России показал, что вирусы были подобны эталону А/Фуцзянь/411/02 и лишь небольшое количество штаммов несколько отличались от эталона (Слепушкин А.Н. С соавт., 2006).

Российские изоляты вируса гриппа А(Н3N2), выделенные Центром экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ) в 2004-2005 гг. являлись антигенными вариантами эталонов А/Фуцзянь/411/2002 и А/Калифорния/07/04 (Минздрав., 2005).

Российские штаммы вируса гриппа (Н3N2) 2005— 2006 гг. Хорошо реагировали с антисывороткой к референс-штамму А/Висконсин/67/2005 (Sominina A. et al., 2013).

При анализе антигенных взаимодействий вирусов гриппа А(Н3N2) циркулирующих на территории России в 2006-2007 гг. с антителами сыворотки референс - штамма А/Висконсин/67/2005, было показано, что данный компонент вакцины является актуальным и продуцируемые им антитела обладают достаточно широким спектром действия, нейтрализуя вирусы гриппа до 1:2-1:4 гомологичного титра (Коновалова Н.И., 2010).

В антигенном отношении популяция российских вирусов гриппа А(Н3N2) 2007-2008 гг., была гетерогенна. Часть изученных изолятов оказалась подобна новому референс-штамму А/Брисбан/10/2007, нейтрализуя антитела сыворотки данного эталона до 1-1:2 гомологичного титра. Кроме того, эта группа вирусов

не утратила родства с эталоном А/Висконсин/67/2005. Вторая группа изолятов демонстрировала низкие титры при взаимодействии с сыворотками как к новому референс штамму, так и к эпидемическим штаммам предыдущих лет выделения. Циркуляция подобных изолятов наблюдалась и в следующем сезоне (Sominina A. et al., 2013, Н.И. Коновалова, 2010).

Антигенный анализ вирусов гриппа А(Н3N2), циркулирующих в России в эпидемический сезон 2008-2009 гг. выявил, что большинство штаммов являлись дрейф-вариантами референс-штамма А/Брисбан/10/2007, включенного в состав вакцин на сезон 2008-2009 гг. Данные изоляты реагировали со штаммоспецифической сывороткой А/Брисбан/10 /07 от 1 до 1:4 гомологичного титра. Однако треть изученных вирусов А(Н3N2), взаимодействовали с этой сывороткой лишь до 1:8 гомологичного титра. Все штаммы сохранили родство с эталоном А/Висконсин/67/2005 и эпидемическими изолятами предыдущего сезона (Н.И. Коновалова, 2010).

В течении первой волны пандемии вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в России в 2009-2010 гг. вирусы гриппа А(Н3N2) практически не детектировались и только 7% вирусов А(Н3N2) было зафиксировано в 2010-2011 гг. (Sominina A. et al., 2013).

Большинство российских вирусов гриппа А(Н3N2) 2011-2013 гг. взаимодействовали с референс-штаммом А/Перт/16/2009, а другие изоляты показывали низкие титры с антисывороткой к вирусам подобным А/Перт/16/2009, но были более антигенно близки штамму А/Виктория/210/2009. Все вирусы реагировали с антисывороткой хорька полученной к новому референс-штамму А/Виктория/361/2011 (Sominina A. et al., 2013).

## **2.4. Молекулярно-генетическое строение генов НА, NA и М-белка вируса гриппа А(Н3N2).**

**2.4.1. Структура белка НА.** Гемагглютинин вируса гриппа А(Н3N2) представляет собой мембранный гликопротеин с молекулярной массой примерно 76,000. НА является основной мишенью для нейтрализующих антител и отвечает

за способность вируса гриппа связываться с клеточными рецепторами хозяина и проникать внутрь клетки (White J. et al., 1997) Молекула гемагглютинина синтезируется в виде предшественника и в дальнейшем подвергается протеолитическому расщеплению на две субъединицы HA1 и HA2 (Wiley D., 1987). Субъединица HA 1 состоит из 319-328 аминокислотных остатков, а субъединица HA2 несёт 221-222 аминокислотных остатков (Bullough P. et al., 1994)

В составе вириона гемагглютинин представлен в виде тримера, состоящего из трёх мономеров, соединённых нековалентной связью. Структурно HA можно разделить на две части – стебель, основание которого находится в липидном слое мембраны и глобулу, которая обращена наружу. Стебель состоит из субъединицы HA2 и части цепи HA1. Головка образована только полипептидной цепью HA1 и содержит большинство сайтов связывания антител и рецептор-связывающий карман, который образован аминокислотами His183, Tir185, Glu190, Leu194. На дне кармана располагаются аминокислотные остатки Tyr98 и Trp53. Края кармана образованы аминокислотными остатками 224-228 и 134-138 (Wiley D., 1987)

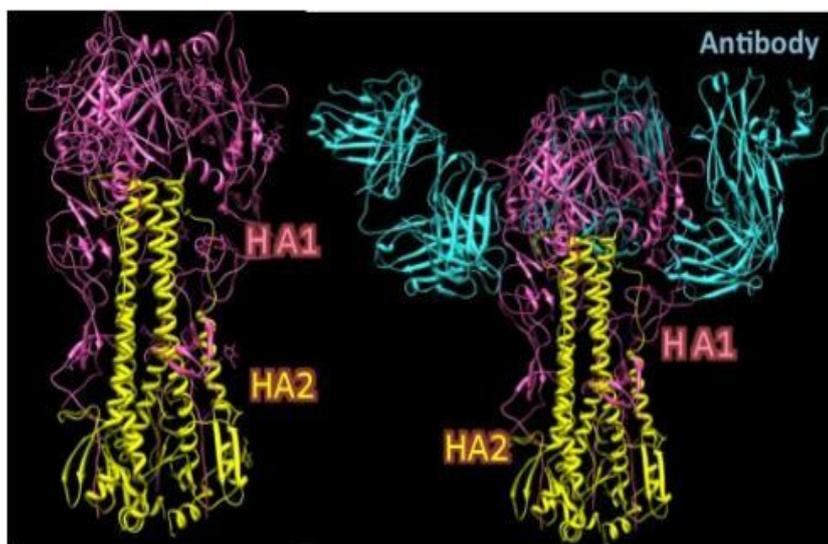


Рис. 3 На рисунке розовые области представляют субъединица HA1, жёлтые области - субъединицы HA2. Синие области - антитела, прикреплённые к трём рецептор - связывающим сайтам в молекуле HA1.

В результате антигенного картирования НЗ было выявлено пять сайтов связывания антител на поверхности глобулярной головки гемагглютинина: А, В, С, D и Е ( Isaeva E.I.,1994, Каверин Н.В.. 2012).

Сайт А представляет собой выдающуюся с поверхности глобулы петлю, которая представлена аминокислотными остатками 133, 137, 140-146.

Сайт В образован внешними остатками аминокислот альфа-спирали 186 -197 и прилегающие к ним остатки верхней границы рецептор-связывающего кармана 155-160.

Сайт С представляет собой выступ в третичной структуре, который расположен вокруг дисульфидной связи на границе стебля и глобулы. Он образует выпуклость, состоящую из аминокислот 53, 54, 275, 276, 278.

Сайт D располагается вблизи поверхности соприкосновения между мономерами, которые образуют тример НА и представлен а.о. 172-174, 201-220, 242, 244, 246.

Сайт E располагается на боковой стороне глобулы между сайтами А и D и содержит а.о. 62, 63, 78-83, 122.

**2.4.2. Структура белка НА.** Нейраминидаза является главным поверхностным гликопротеином вирусов гриппа, который расщепляет связь между сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислотой и соседними остатками сахара. Молекула НА существует в виде тетраметра со средней молекулярной массой 220.00, состоящим из 4 гомологичных субъединиц, заякоренного в вирусной мембране с помощью одной гидрофобной последовательности из 29 аминокислот, расположенной возле N-конца белка (Varghese J., 1983). Полипептидная цепь нейраминидазы содержит примерно 470 аминокислотных остатков (Laver W., 1987).

Нейраминидаза вируса гриппа выполняет несколько функций. Во-первых, её активность необходима во время начинающего образования вирусных частиц с поверхности инфицированной клетки, для предотвращения их агрегации. Кроме того, НА расщепляет нейраминовые остатки муцина, который находится в дыхательных путях, тем самым, облегчая вирусные движение в клетки-мишени (Mikhail N., 2004).

Трёхмерная структура показала, что НА состоит из 4 областей: цитоплазматического домена, трансмембранного домена, головки и стволовой

части (Bossart-Whitaker P., 1993)

В головке NA располагаются активный центр фермента, который состоит из двух компонентов: сайта связывания сиаловой кислоты и сайт связывания иона кальция (Colman P.M., 1989, WHO, 2012). Сайт связывания сиаловой кислоты нейраминидазы принимает участие в расщеплении сиаловой кислоты на мембране клетки хозяина. В состав этого сайта входят функциональные аминокислотные остатки Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371, и Tyr406, которые связаны с каталитической функцией фермента и структурных аминокислотных остатков Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp 198, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293 и Glu42 (Garman E., 2005). Функциональные аминокислотные остатки находятся в непосредственном контакте с сиаловой кислоты и все они образуют полярные с ней связи, за исключением Arg224, чья алифатическая часть образует неполярные контакт с глицериновым остатком Neu5Ac.(Varghese et al., 1992).

Сайт связывания кальция, который располагается внутри молекулы, образован кислородом главной цепи остатков 297, 345 и 348, и кислородом боковой цепи Asp324, располагающимся в боковой цепи, а также аминокислотными остатками 293, 347, 111-115 и 139-143 (Takahashi T. et al., 2003). Функция сайта связывания иона кальция до конца не ясна. Предполагается, что присутствие иона кальция способствует термостабильности, или позволяет ферменту продолжать функционировать в условиях высоких температур.

Цитоплазматический участок состоит из 6 высоко-консервативных аминокислот. Мутации в этом и трансмембранном участках белка могут влиять на его экспрессию, созревание, транспорт, сборку вирусных частиц, и ферментативную активность НА. Для трансмембранных структур характерно наличие гидрофобных аминокислот (аланин и изолейцин) и полярные аминокислоты (треонин и серин), необходимые для тетраимизации нейраминидазы. Аминокислотная последовательность стволовой части НА вируса гриппа низкоконсервативна. Она является наиболее вариабельным

участком NA, его длина может варьировать от 25 до 57 н.о. (Varghese J., 1991). Существует восемь консервативных дисульфидных связей в структуре NA и существует одна дополнительная связь у вирусов гриппа А(Н3N2) (Cys175 - Cys193).

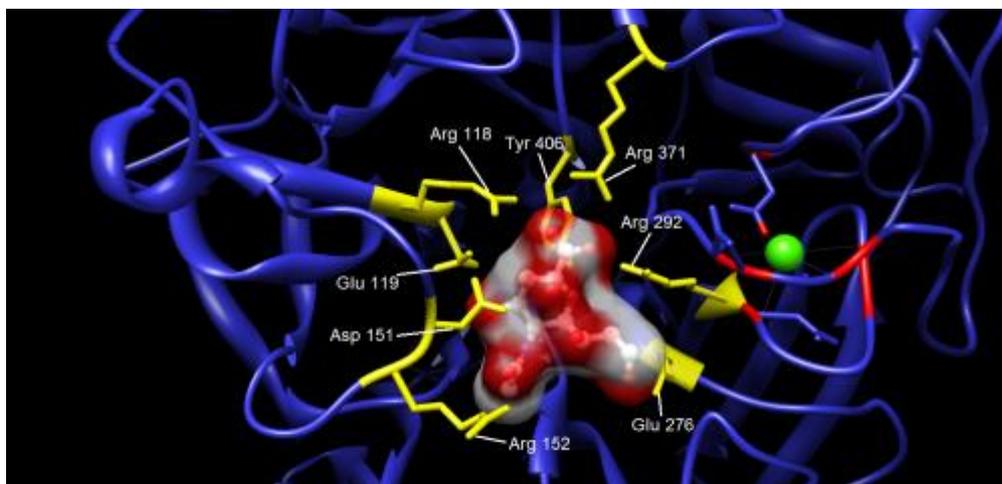


Рис. 5 На картинке показаны активный сайт нейраминидазы и сайт сиаловой кислоты. Сиаловая кислота удерживается на месте с помощью остатков, выделенных желтым цветом, которые помогают создать карман для сиаловой кислоты. Активный центр нейраминидазы имеет сайт связывания иона кальция (ион кальция окрашен в зелёный цвет, а пять молекул кислорода с которым он связан, в красный).

### 2.4.3. Структура М-белка.

Ген М кодирует сразу два белка: матричный М1 и мембранный М2 и выполняет большое количество функций (Lamb R., 1981). Белок М1 кодируется полноразмерной мРНК, комплиментарной всей кодирующей части 7-го сегмента. Матричная РНК для белка М2 получается в результате сплайсинга, при котором вырезается 689 н.о. Начиная от места сплайсинга, аминокислотные последовательности не совпадают, поскольку трансляция идёт со сдвигом рамки +1. В вирионе он образует внутренний слой оболочки (Palese P., 1986).

М1 (с 26 по 784 н.о.) - матриксный белок, который располагается прямо под вирусной оболочкой в форме димеров и находится во взаимодействии с вирусным рибонуклеопротеинным комплексом (vRNP) (Baudin F., 2001). Он контактирует как с вирусной РНК, так и с нуклеокапсидным протеином, способствующим образованию рибонуклеопротеиновых комплексов и

приводящий к отсоединению рибонуклеопротеина от ядерного матрикса (Elster С., 1997). Белок М1 имеет несколько гидрофобных участков. М1 играет важную роль в сборке путем набора вирусных компонентов к месту сборки и существенную роль в процессе почкования, включая формирование вирусных частиц. М1 состоит из двух доменов соединены компактной последовательностью: N- концевой домен, который имеет мультиспиральную структуру, состоящую из двух подобластей и С-концевой домен, содержащий альфа - спиральную структуру ( Harris A., 2001).

М2 (с 26 по 51 н.о. и с 740 по 1007 н.о.) - мембранный белок, который включён в вирусную оболочку и представлен на поверхности вируса в виде тетрамеров (Lamb R., 1985). Белок М2 включает в себя 97 аминокислот: 24 в экстрацеллюлярной домене, 19 в трансмембранном домене и 54 в цитоплазматическом домене (Wang J., 2011). Цитоплазматический домен белка М2 распознаётся иммунной системой хозяина. (Gerhard W., 1997). Трансмембранный домен имеет активность ионного канала, который вовлечён в процесс “раздевания” вируса в клетке. Цитоплазматический домен М2 взаимодействует с М1 и является необходимым для упаковывания генома и формирования вирусных частиц (Furuse Y., 2009).

## **2.5. Изменения в последовательностях НА и их влияние на свойства штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в мире с 2003 по 2013 гг.**

Известные мутации, которые встречаются в антигенных сайтах, уменьшают или ингибируют связывание нейтрализующих антител, позволяя тем самым, новому подтипу распространяться среди неиммунизированного населения. Такой феномен называется антигенный дрейф (Hampson A., 2002). Постоянный антигенный дрейф в молекулах гемагглютинина и нейраминидазы меняет антигенные свойства вирусов таким образом, что это приводит к смене эталонных и вакцинных штаммов. Мутации, которые вызывают антигенный дрейф, являются молекулярно-генетическим объяснением эпидемии сезонного гриппа в зимнее время в умеренных климатических зонах (Nicholson K., 1998).

Изменения, произошедшие в антигенном сайте В в последовательностях НА вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших с 2003 по 2005 привели к тому, что по своим антигенным и молекулярно-генетическим свойствам они были близки новому эталонному А/Велингтон/1/2004 (вирус подобный А/Фуцзян/411/02) (WHO, 2004). У других штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) изменение коснулось антигенного сайта А в позиции 145 (K145N), что позволило им образовать отдельную группу вирусов, подобных А/Калифорния/7/2004 (таб. 2).

Опытным путем было показано, что мутация K145N связана с изменением заряда от заряженной к незаряженной аминокислотной R группе (Wiley D. et al., 1981). Это изменение могло повлиять на белково-белковые взаимодействия, так как оно располагается внутри антигенного сайта А, с которым связываются нейтрализующие антитела (Wilson A et al., 1990). Кроме того, поскольку замена K145N располагается внутри сайта гликозилирования, смена заряда могла повлиять на активность гликозилтрансферазы, которая приводит к изменению в гликозилировании, что сказывается на связывании антител с антигенными сайтами (Wilson A et al., 1983). В дополнение к этому, проведенный 3-х мерный анализ НА показал, что эта аминокислотная замена K145N может также содействовать активизации связывания рецептора с аспарагином R группы (Daum L. 2005). Также у штаммов вируса гриппа А(Н3N2) в субмолекуле НА1 была найдена замена V226I. Было выявлено, что остаток 226 является ключевой аминокислотой в детерминации рецепторной специфичности (Rogers G. et al., 1983) и изменение Val-226→Ile связано со снижением рецептор - связывающего сродства вирусов гриппа А(Н3N2) (Lu B. et al., 2006). Вторая группа вирусов была представлена репрезентативным штаммом А/Крайстчерч /28/03 и содержала аминокислотную замену N126D, которая была связана с потерей потенциального сайта гликозилирования (Monica G., 2012).

В 2005-2006 гг. в антигенном сайте В в последовательностях НА появилась замена S193F. Проведенные эксперименты в области антигенных сайтов гемагглютинаина вируса гриппа А(Н3N2) показали важность замены Ser -193 → Phe (S193F), которая связана со снижением сродства к рецепторам человека у

вирусов, циркулирующих в 2005 году, в сравнении с вирусами 2004 года (Nobusawa E. et al., 2005). Два изменения, произошедшие в последовательностях HA S193F и D225N позволили отнести вирусы гриппа А(Н3N2) к новому эталонному штамму А/Висконсин/67/2005 (Martin, J., 1998).

За некоторым исключением, последовательности гемагглютиниона штаммов вируса гриппа А(Н3N2) 2006-2007 гг. принадлежали клайду, представленному эталонами А/Висконсин/67/2005 и А/Хирошима/52/2005 (WHO, 2007). Новые в сравнении с предыдущем сезоном замены разделили клайд А/Висконсин/67/2005 на четыре генетические группы (таб. 2). Интересно отметить, что замена N145K, найденная в антигенном сайте А, уже встречалась ранее в последовательностях гемагглютиниона вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших между 1992 и 1995 гг. (Li Y. et al., 2013). С помощью обратной генетики было показано, что замена N145K повышает вирусное рецептор-связывающее сродство. Кроме того, антисыворотки, полученные против штаммов вируса гриппа А(Н3N2), несущие K145N снизили свое взаимодействие со штаммами А(Н3N2), обладающие N145K, что сказалось на антигенных свойствах вирусов гриппа А(Н3N2) (Chen Z. et al., 2010).

Последовательности HA изолятов вирусов гриппа А(Н3N2) 2007-2008 гг. принадлежали филогенетической группе, представленной эталонным штаммом А/Брисбан/10/2007 с заменами G50E и K140I (антигенный сайт А), характерными для эталона А/Висконсин/67/2005 в последовательностях HA (Baek, 2009).

Большая часть вирусов 2008-2009 гг. формировала филогенетический клайд А/Брисбан/10/2007 и приобрела характерный генетический маркер данного клайда в последовательностях HA K173Q, расположенный в антигенном сайте D (табл. 2) (Lees et al., 2010).

В сезоне 2009-2010гг., когда в популяцию циркулирующих штаммов внедрился новый пандемический вирус гриппа свиней А(Н1N1)pdm09 штаммы вируса гриппа А(Н3N2) почти полностью вытеснены из популяции. (Бурцева Е.И с соавт. 2011, Киселев О.И, 2011)

Генетический анализ небольшого количества последовательностей НА вирусов гриппа А(Н3N2), изученных в 2009-2010 гг. продемонстрировал, что большинство вирусов принадлежали примерно в одинаковом количестве двум генетическим клэйдам: А/Перт/16/2009 и А/Виктория/208/2009. Эти клэйды были дифференцированы заменами Е62К (сайт Е) и N144К (сайт А) (клайд Перт/16) и T212А (клайд Виктория/208) в молекуле НА, хотя по антигенному анализу отличить один клайд от другого было невозможно (таб.2). Новая замена в позиции 144 (N144К) привела к потере сайта гликозилирования (Isolde C. et al, 2012). Также оба клэйда разделяли новые аминокислотные замены в НА K158N и N189K, которые находились в антигенном сайте В (Denis K, 2011).

В сезоне 2010-2011 гг. наблюдалась циркуляция нескольких генетических групп вирусов гриппа А(Н3N2). Как и в предыдущем сезоне, вирусы принадлежали генетическим клэйдам Перт/16 и Виктория/208, которые разделялись на генетические группы, соответственно заменам, найденным в последовательностях НА (таб.1) Две замены, произошедшие в антигенном сайте А в позициях 133 (N133D) (Alireza E. et al., 2013) и 144 (N144D) (Pariani E., 2013) были связаны с потерей потенциального сайта гликозилирования, а замена S45N с приобретением сайта гликозилирования (Julie A. et al., 2012).

В связи с большим количеством аминокислотных замен, встречающихся в последовательностях вирусов гриппа А(Н3N2), начиная с 2011 года, их стали разделять на генетические группы, в зависимости от ключевых замен в последовательностях НА1. Таким образом, в 2011-2012 гг. штаммы представляли 7 генетических групп: первые две группы принадлежали генетическому клэйду Перт/16 (WHO, 2012, Kossyvakis A. et al., 2012) (таб. 1).

Генетический анализ генов НА, вирусов, циркулирующих в 2012-2013 гг. показал, что они представляли клайд А/Виктория/208 и в основном принадлежали 3 генетическим группам: 3, 5 и 6 (WHO, 2012-2013, Sandie R, 2013) (таб. 2).

Интересно, что в 2013 году в Национальном Центре Гриппа в Дании было показано, что штаммы вируса гриппа А(Н3N2) могли быть причиной низкой

эффективности вакцинации у людей пожилого возраста, т.к. они обладали ключевыми заменами, которые располагались в позициях 128 и 142. Замена A128 явилась причиной потери N-связанного сайта гликозилирования, а аминокислотные изменения в регионе 140-146 в антигенном сайте А в молекуле HA были характерны для антигенно отличных вирусов эпидемического значения. Эти две замены играют важную роль в антигенном дрейфе вирусов гриппа A(H3N2) (Bragstad K., 2013).

## **2.6. Изменения в последовательностях HA и их влияние на свойства штаммов вируса гриппа A(H3N2), циркулировавших в России с 2006 по 2012 гг.**

Филогенетический анализ российских штаммов вируса гриппа A(H3N2) 2006-2007 гг. показал, что они относились к двум генетическим группам (рис. 4). К первой группе принадлежали вирусы гриппа подобные штамму A/Висконсин/67/2005, которые имели ряд замен в последовательностях HA: T128A, R142G ( антигенный сайт А), K173E (сайт D). Замена T128A приводила к потере потенциального сайта гликозилирования, а замены R142G и K173E встречались у штаммов, циркулирующих в предыдущих сезонах, и приводили к смене заряда аминокислотного остатка. Также у некоторых вирусов этой группы была выявлена замена L157S в антигене сайте В, замена N145K в сайте А и D188E в сайте В. Другие вирусы несли замены S193F в сайте В, N216S в сайте D и V112I. Ко второй группе принадлежали штаммы подобные эталону A/Брисбан/10/2007, который нес замены G50E и K140I (сайт А) (Грудинин М.П., 2012).

Российские вирусы гриппа A(H3N2) 2007-2009 гг. были генетически родственны вакцинному штамму A/Брисбан/10/2007, с характерными для них заменами в HA G50E и K140I (сайт А) (рис.4). Кроме того, в пределах данной генетической клады наблюдался небольшой отдельный кластер, состоявший из ряда московских изолятов. Для последовательностей HA этого кластера была характерна мутация K92R. Среди штаммов не было ни одного относящегося к новой филогенетической линии A/Перт/16- подобных штаммов. Таким образом,

штаммы вируса гриппа А (H3N2) 2008-2009 гг. являлись эволюционным продолжением штаммов эпидемического сезона 2007-2008 гг. (Комиссаров А.Б., 2012).

В сезоне 2010-2011 гг. вирусы гриппа А (H3N2) не имели эпидемического значения, единичные случаи выявления вирусов данного подтипа были отмечены в Европейской части России, а в Сибири и на Дальнем Востоке вирус гриппа А (H3N2) проявлял слабую активность. Все вирусы, выделенные на востоке РФ, относились к генетической группе А/Виктория/210/2009 (R261Q) клайда А/Перт/16/2009 (E62K, N144K) (рис. 4). Гемагглютинин этих вирусов содержал ряд замен в антигенном сайте E2. Вирусы, циркулирующие в Европейской части РФ, относились к генетической группе А/Перт/10/2010 клайда А/Виктория/208/2009 и имели замены в антигенном сайте С (Soboleva I., 2012).

Вирусы гриппа А (H3N2) эпидемического сезона 2011-2012 гг, циркулирующие на территории России, относились к генетической группе А/Стокгольм/18/2001 (V223I) клайда А/Виктория/208/2009 и несли аминокислотную замену N312S (рис.4). Штаммы разделяли на две подгруппы с характерными заменами N145S в антигенном сайте А, D487N и Q33R, S45NT с возникновением потенциального сайта гликозилирования, T48I и N278K – в антигенном сайте С, T128N, A198P – в антигенном сайте В, соответственно (Грудинин М.П., 2012).

**Аминокислотные изменения в последовательностях гемагглютинина вирусов гриппа В,  
циркулировавших с 2003 по 2013 гг.**

Сезон	Эталонные штаммы	Сайт А	Сайт В	Сайт С	Сайт D	Сайт Е	Субмолекула HA1
2003-2004	А/Фуцзян/411/02 А/Велингатон/1/2004	н/н	Y159F S189N	н/н	н/н	н/н	V226I
2004-2005	А/Калифорния/7/2004	K145N (D)	н/н	н/н	н/н	н/н	V226I
	А/Крайстчерч /28/03	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	N126D
2005-2006	А/Гонконг/4443/2005	н/н	S193F	н/н	н/н	н/н	D225N
	А/Висконсин/67/2005	н/н	S193F	н/н	н/н	н/н	D225N
2006-2007	А/Висконсин/67/2005	K140I R142G N144D N145K	S193F	G275S D53N G275D	K173E N216S	н/н	н/н
	А/Хирошима/52/2005	н/н	S193F	н/н	н/н	н/н	н/н
2007-2008	А/Висконсин/67/2005	R142G N144D	L157S	н/н	K173E		н/н
	А/Брисбан/10/2007	K140I	н/н	н/н	н/н	н/н	G50E
2008-2009	А/Брисбан/10/2007	н/н	н/н	н/н	K173Q	н/н	н/н
2009-2010	А/Перт/16/2009	N144K	K158N N189K	н/н	н/н	E62K	н/н
	А/Виктория/208/2009	н/н	K158N N189K	н/н	н/н	н/н	T212A
2010-2011	А/Перт/16/2009	N133D R142G	н/н	н/н	н/н	н/н	V213A
		н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	E50K,P162S, I260M&R261Q
	А/Виктория/208/2009	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	N312S T48A K92R
		н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	S45N
		N145S N144D	н/н	н/н	н/н	н/н	V223I V323I
		н/н	н/н	D53N	н/н	н/н	Y94H I230V E280A S199A
2011-2012	А/Перт/16/2009	N144K	н/н	E62K	н/н	н/н	T212A, P162S, I260M&R261Q
		N144K N133D R142G	н/н	E62K	н/н	н/н	N133D V213A
	А/Виктория/208/2009	N144D N145S	н/н	н/н	н/н	н/н	V223I&D487N
		N145S	н/н	н/н	н/н	н/н	A198S V223I N312S&D487N
		н/н	н/н	D53N N278K	н/н	н/н	Q33R L3I S45N T48I A198S V223I&N312S I522T
		н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	N312S
		н/н	н/н	D53N	н/н	н/н	Y94H I230V E280A
		н/н	н/н	D53N	н/н	н/н	Y94H S199A I230V &E280A
		н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	S45N
2012-2013	А/Виктория/208/2009	N144D	D158N	н/н	н/н	н/н	V223I
		N145S					
		N145S N144D	D158N	н/н	н/н	н/н	A198S V223I&N312S
		S145N	н/н	н/н	н/н	н/н	S45N T48I A198S V223I&N312S
		н/н	н/н	D53N	н/н	н/н	K2E N8D Y94H I230V&E280A
		н/н	н/н	D53N	н/н	н/н	Y94H S199A I230V&E280A

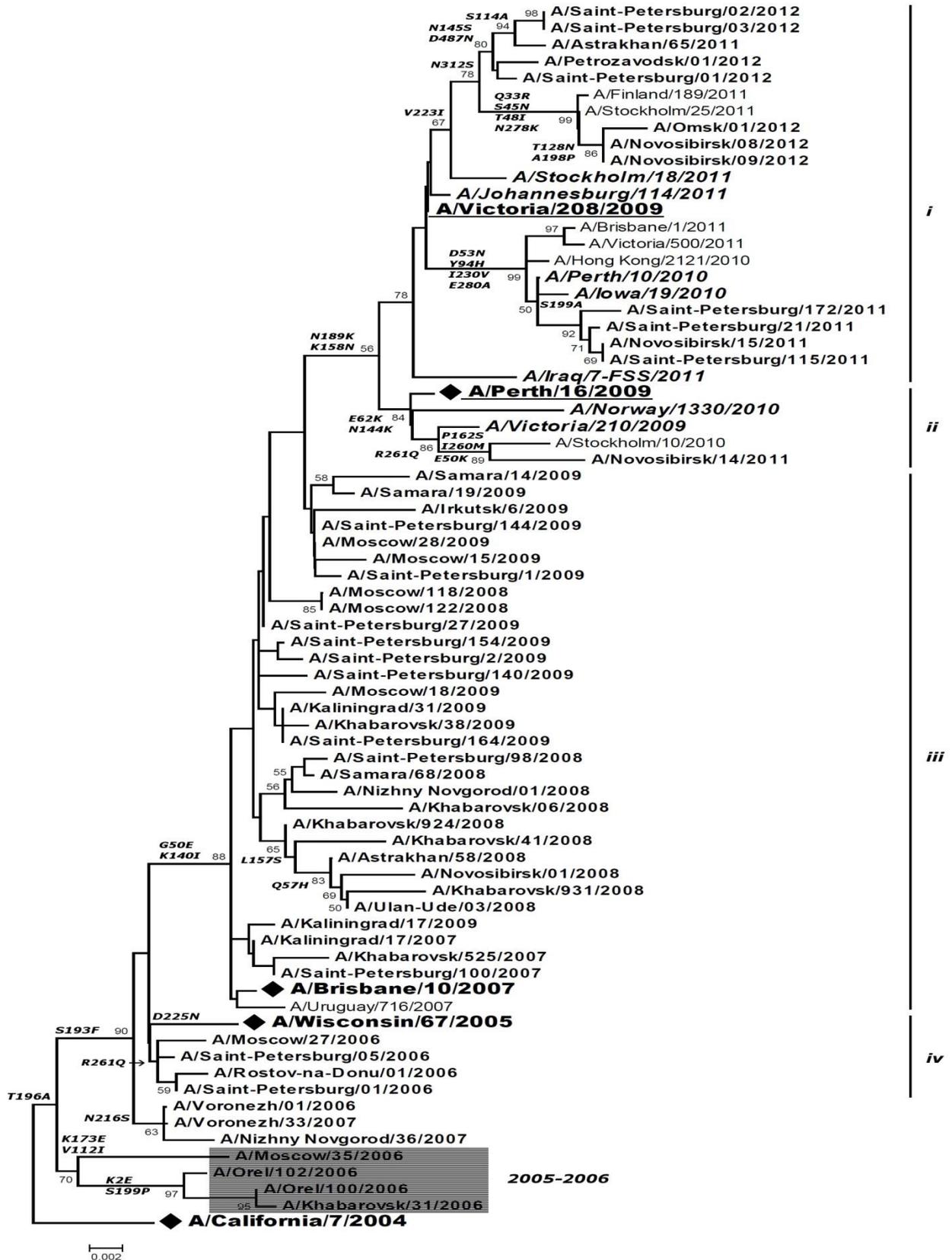


Рис. 4. Филогенетическое сравнение последовательностей гемагглютинаина вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших в период 2005-2012 гг. (по данным Писаревой М.М.)

## **2.7. Изменения в последовательностях NA и их влияние на свойства вирусов гриппа А(Н3N2), циркулирующих с 2003 по 2013 гг. в мире**

Последовательности нейраминидазы вирусов гриппа А(Н3N2) 2003-2005 гг. представляли две генетические группы: А/Велингтон/1/04, с генетическими маркерами N93D, Q432E ( Lin J. , 2011) (таб.2) и А/Шантоу/1219/04 с характерными заменами I215V и K431N (WHO, 2003-2004) (таб.3).

Большинство последовательностей NA приобрели замену D193N, которая являлась генетическим маркером всех штаммов вируса гриппа А(Н3N2) 2005-2006 гг., принадлежащие клайду А/Висконсин/67/2005 (WHO, 2005-2006).

В период с 2006-2008 гг. активно циркулировали дрейф варианты вирусов гриппа А(Н3N2), которые принадлежали клайду А/Висконсин/67/2005 и разделились внутри него на несколько генетических групп, содержащих специфические замены (таб. 3) (WHO, 2006-2008).

В эпидемическом сезоне 2008-2009 гг. в последовательностях нейраминидазы встречались новые генетические маркеры эталонного штамма А/Брисбан/10/2007 D147N, I215V (WHO, 2008-2009, Vyatugaba D., 2011). Кроме того, последовательности NA многих европейских штаммов образовали отдельную субгруппу, содержащую дополнительные замены P386H и I464L (Barr I., 2010)

Генетический анализ последовательностей NA вирусов гриппа А(Н3N2) 2009-2010 гг. продемонстрировал, что большинство вирусов принадлежали двум генетическим клайдам: А/Виктория/208 и клайд А/Перт/16 с характерными для них заменами (WHO, 2009-2010) (таб. 3).

Последовательности NA 2010-2011 гг. принадлежали генетическим клайдам А/Виктория/208/2009 и А/Перт/19/2009, который был представлен двумя генетическими группами – А и В (таб.2) (WHO, 2010-2011).

В 2011-2012 гг. произошло разделение вирусов гриппа А(Н3N2) на семь генетических групп (таб. 3).

В следующем эпидемическом сезоне 2012-2013 большинство последовательностей NA принадлежали 3С генетической группе

(А/Виктория/361/11). Также циркулировали штаммы входящие в 3 А, 3 В, 5, 6 и 7 генетические группы. Наиболее важные аминокислотные изменения, которые встречались в последовательностях нейраминидазы вирусов гриппа А(Н3N2) 2011-2013 гг. – двойная замена S367N&K369T, которая привела к добавлению сайта гликозилирования в остатке 367. Другие сайты гликозилирования терялись в остатках 402 (N402D), 329 (N329S) и 331 (S331R) (WHO, 2011-2013).

В период с 2005 по 2012 гг. в циркуляции вирусов гриппа А (Н3N2) встречались штаммы в последовательностях NA которых встречалась замена D151G (Mishin V., 2013). (Gregory V. et al., 2009). Эта замена вызывала изменения в специфичности NA таким образом, что она приобрела способность связываться с рецепторами, которые были невосприимчивы к ферментативному расщеплению (Lin Y., 2010). Штаммы вирусов гриппа А(Н3N2) с заменой D151G в последовательностях нейраминидазы встречались в некоторых странах мира, так, например, учёным из Южной Кореи удалось детектировать данную замену в каталитическом сайте NA в сезоне 2007-2008 у двух штаммов А/Чхонджу /Н383/08 и А/Чхонджу /Н407/08 (Baek, 2009).

#### **2.8. Замены в последовательностях белка нейраминидазы, связанные с резистентностью к лекарственным препаратам.**

Введение в 1999 году в широкую практику ингибиторов нейраминидазы привело к возникновению резистентных штаммов вирусов гриппа А(Н3N2). Однако случаи резистентных штаммов с маркерными мутациями устойчивости к озельтамивиру (E119V, R292K, N294S) и занамивиру (Q136K) (McKimm-Breschkin J., 2003, Hui-Ling Y., 2006, Nguyen H.T., 2013), как правило, связаны с проводимым курсом лечения и встречаются довольно редко - частота их формирования в популяции эпидемических штаммов ежегодно не превышает 1-3%. (Белякова Н.В., 2010). Так, в 2012-2013 гг. по данным Отдела гриппа Центра по контролю за заболеваемостью и профилактике (CDC&P, Атланта, США) из 2123 исследованных штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) лишь два штамма были резистентны к озельтамивиру (0,1%). В работе Ruiz-Garrascoso G., 2010 был зафиксирован случай двойной мутации E119V в нейраминидазе и

V27A в M2-белке у ребёнка с пониженным иммунитетом, которая привела к резистентности к ингибиторами NA и препаратам адамантинового ряда. В 2007-2008 гг. в Мьянме были зафиксированы штаммы вируса гриппа A(H3N2) (1,5%), с мутациями Q136K в NA и S31N в M2 белке, которые обладали пониженной чувствительностью к занамивиру и ремантадину, но были чувствительны к озельтамивиру (Darat С., 2010). По данным ЦЭЭГ и НИИ гриппа (Санкт-Петербург) в России с 2006 по 2013 гг. у всех штаммов вируса гриппа A(H3N2), выделенных из носоглоточных смывов, методом частичного секвенирования маркерных мутаций, связанных с резистентностью к озельтамивиру и занамивиру найдено не было (Белякова Н.В., 2011, Sominina, 2013).

### **2.9. Изменения в последовательностях M-белка и их влияние на свойства вирусов гриппа A(H3N2).**

M2-белок у вируса гриппа A(H3N2) является мишенью для антивирусных препаратов амантадина и ремантадина (De Clercq E., 2006, Cady S.D., et al, 2010), которые связываются непосредственно с протонным каналом (Wang J., et al. 2011). Для ингибиторов M2 белка – адамантанов (амантадина и римантадина) была проведена идентификация аминокислотных мутаций в гидрофобной области белка и были выявлены положения: 26, 27, 30, 31, 34, которые являются маркерами устойчивости к адамантанам (Belshe R., 1988). Две замены встречались в последовательностях M2 белка с 2003 по 2013 гг. - аминокислотная замена в положении 27 (V27A), которая располагается в трансмембранном домене белка M2 и подвергается действию положительной селекции (Schmidtke M, et al., 2006) и замена в сайте 31 в M2, которая не была связана с действием позитивного давления, однако, именно она является главной мутацией, которая отвечает за устойчивость к амантадину, т.к. детектируется практически в 100% случаев у штаммов вируса гриппа A(H3N2), изолированных от людей в последнее несколько лет (Pielaka R.M, 2009).

Хотя амантадин широко использовался в течение нескольких десятков лет, возникшая у вирусов гриппа резистентность к лекарству заставило отказаться от его использования (Krumbholz A, et al., 2009). В работах Шмелевой Н.П.,

Ротанов М., Бурцевой Е. И., Шевченко Е.С. Nelson M., Bright R.A., Rick.A., показано мировая тенденции снижения чувствительности вирусов гриппа А (H3N2) к препаратам адамантанового ряда. Так уровень резистентности к препаратам этой группы среди вирусов гриппа А (H3N2) начал увеличиваться в Азии в сезоне 1998-1999 и заметно возрос в Китае с 57,5% в 2002-2003гг до 73,8% в 2003-2004 гг. В России снижение чувствительности к ремантадину обнаружено в 9,5% в сезоне 2002-2003гг., 38 и 44% в 2004-2005 и 2005-2006гг соответственно. В США уровень резистентности вирусов гриппа А к адамантанам значительно возрос с 1,9% в эпидемическом сезоне 2003-04 до 92% в сезоне 2005-06 гг. Все эти данные послужили основанием к запрещению использования препаратов адамантанового ряда в сезон 2005-2006 гг .

**Аминокислотные изменения в последовательностях нейраминидазы вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших с 2003 по 2013 гг.**

Сезон	Эталонный штамм	Генетические маркеры	Замены, связанные с потерей потенциального сайта гликозилирования	Замены, связанные с приобретением потенциального сайта гликозилирования	
2003-2005	А/Велингтон/1/2004	N93D Q432E	н/н	н/н	
	А/Шантоу/1219/2004	I215V K431N	н/н	н/н	
	А/Крайстчерч/20/03	Y40H, T19A	н/н	н/н	
2006-2007	А/Висконсин/67/2005	D193N	н/н	н/н	
2007-2008	А/Висконсин/67/2005	L370S H150R Y310H V194I N387K	н/н	н/н	
2008-2009	А/Брисбан/10/2007	D147N, I215V	н/н	н/н	
2009-2010	А/Виктория/208/2009	I26T Y40C	н/н	н/н	
	А/Перт/16/2009	I469V	н/н	н/н	
2010-2011	А/Виктория/208/2009	N43Y, I464L, T238A, S416N, N393S	н/н	S367N& K369T	
	А/Перт/16/2009	Группа А	R430S, D127N, I307M, L338F N342D	N402D	н/н
		Группа В	H150R, V190L, L285P, Y310H, L370S, S372L N387K	N93D	н/н
2011-2012	А/Перт/16/2009	Группа 1	D127N, I307M, L338F	н/н	н/н
		Группа 2	L338S	н/н	н/н
	А/Виктория/208/2009	Группа 3А А/Стокгольм/18/2011	E221D, T238A, S416N	н/н	S367N&K369T
		Группа 3 В А/Англия/259/2011	D463N L81P I464L	N329S N402D	S367N&K369T
		Группа 3 С А/Гонконг/3969/2011	D197N E258K, D93G L81P I464L	N329T N402D	S367N&K369T
		Группа 4 А/Сербия/71/2011	I464L L81P	N402D	S367N&K369T
		Группа 5 А/Перт/10/2011	I464L L81P I77T I30V, L81P, P468H I26T, K328R	N402D	S367N&K369T
		Группа 6 А/Перт/10/2011	I464L L81P I77T I30V, L81P, P468H I26T, K328R	N402D	S367N&K369T
		Группа 7 А/Алабама/04/2011	I464L N43H	S331R	S367N&K369T
2012-2013	А/Виктория/208/2009	Группа 3А А/Стокгольм/18/2011	E221D, T238A, S416N I30V S335G, I469V	н/н	S367N&K369T
		Группа 3В А/Афины/112/2012	I26T, H310R I262V	N402D	S367N&K369T
		Группа 3 С А/Виктория/361/2011	P126S D197E I77M, I397V G93D D197E D93G	N402D	S367N&K369T
		Группа 5 А/ Азорские острова /SU43/2012	G346D S315R	N402D	S367N&K369T

### ***ГЛАВА 3. Характеристика вируса гриппа В.***

**3.1 История вируса гриппа В.** Штаммы вируса гриппа типа В впервые были выделены в 1940 год независимо друг от друга Франсисом (Т. Francis) в Америке и Меджиллом (Т. Magill) в Англии (Александрова Г.И., 1989). С тех пор, эпидемии гриппа типа В возникали раз в 3 - 4 года, распространяясь медленнее чем вирусы гриппа А и характеризуясь затяжным течением, ограничиваясь территориями отдельных городов. Смена антигенных вариантов нового подтипа происходила с интервалом в 10 - 20 лет, отличия между ними были выражены значительно менее резко, чем у вируса типа А. Появление нового антигенного варианта вируса типа В сопровождалось постепенным исчезновением ранее циркулировавших вирусов, в связи с чем в одной и той же местности могли быть выделены варианты вируса типа В, отличающиеся по антигенным свойствам (Ларионова Н.В., Иванова А.В., 2004).

Такое поведение вирусов отмечалось до 1988 года, пока в условиях их низкой эпидемической активности не наметился дивергентный характер эволюции. С этого времени в циркуляции регистрировались две антигенные разновидности вирусов гриппа В: вирусы подобные эталонному штамму В/Виктория/2/87 и вирусы подобные эталонному штамму В/Ямагата/16/88 (Chen R., 2008). Преимущественное распространение в мире при этом получили возбудители, родственные эталону В/Ямагата/16/88. Активность вирусов гриппа В резко усилилась: эпидемии на территории России стали отмечаться значительно чаще - через 1-2 года, а с 1993 года практически ежегодно (Laver, G. et al, 2001, Nicholson, K. et al. 2003). Исключением был только сезон 1997-1998 годов, когда в России не было выделено ни одного штамма вируса гриппа В. С 1990 и по 2001 год, как правило, на территории России наблюдалась сочетанная циркуляция вирусов гриппа А и В. За это время с участием вируса гриппа В было зарегистрировано 13 эпидемий : 5 – обусловлены социркуляцией вирусов гриппа А(Н3N2) и В, а 8-социркуляцией вирусов А(Н1N1), А(Н3N2) и В (Литвинова О.М., 2001). При этом, с 1990 года преимущественное распространение в мире получили возбудители, родственные эталону

В/Ямагата/16/88. В пределах линий В/Ямагата/16/88-подобных вирусов гриппа происходил постоянный антигенный дрейф. Постепенно одни варианты замещались другими. С 1991 по 2001 вирусы гриппа В В/Викторианской линии не идентифицировали нигде кроме Азии, а с марта 2001 года их детектировали по всему миру (Ikonen N., 2005).

В последние десятилетия зарегистрированы эпидемически значимые реассортанты вируса гриппа типа В между двумя эволюционными линиями. Так, в работах McCullars J.A. et al. и в годовых отчетах ВОЗ представлены данные о том, что были выделены штаммы с нейраминидазой от вирусов Викторианской линии и гемагглютинином В/Ямагатской линии (McCullars J., 2004).

Что касается последних десяти лет (2003-2013 гг.), по сообщению Всемирной Организации Здравоохранения вирусы гриппа В также занимали значительную часть в циркуляции всех вирусов гриппа. В сезоне 2003-2004 на их долю пришлось 6%, из которых треть вирусов были представителями В/Ямагатской линии, а остальная часть принадлежала В/Викторианской линии; в 2004—2005 гг. 19% исследуемых вирусов были вирусы гриппа В В/Ямагатской линии и 4% линии Виктория; в сезоне 2005-2006 преобладали вирусы В/Викторианской линии-26% и 9% линии Ямагата; в 2006-2007 в мире встречались спорадические случаи циркуляции вирусов гриппа В В/Ямагатской линии – на их долю пришлось всего 3%; в 2007-2008 гг. также встречались только вирусы В/Ямагатской линии-21%, а в сезоне 2008-2009 в циркуляцию вернулись вирусы В/Викторианской линии и на долю двух эволюционных линий вируса гриппа В пришлось по 6 % от всего количество исследуемых вирусов гриппа. В следующем сезоне 2009-2010, когда в циркуляции абсолютную доминирующую роль играл новый пандемический вирус гриппа А(H1N1)pdm09 вирусы гриппа В детектировали в единичных случаях и их доля составляла не более 1,5-2 %, однако в следующем эпидемическом сезоне наблюдается активная циркуляция вирусов гриппа В, где основную часть вирусов представляют линию Виктория 33% и небольшое количество линию Ямагата-2%; в 2011-2012 детектировали 5,4% вирусов гриппа В В/Ямагатской линии и 2,9% вирусов линии Виктория, а в

сезоне 2012-2013 6,4% В/Викторианской линии и 21,3 % линии Ямагата (WHO 2004-2013).



**Рис.6** Циркуляция вирусов гриппа В с 2003-2013 гг.

**Таблица 4**

**Антигенный дрейф вируса гриппа В с 2003-2013 гг.**

Эпидемический сезон	Рекомендации ВОЗ по вакцинному штамму	Принадлежность к эволюционной линии	Циркулировавшие штаммы в сезоне
2003-2004	В/Гонконг/330/2001	Виктория-подобный	доминирование В/Ямагата-подобных
2004-2005	В/Шанхай/361/2002	Ямагата-подобный	доминирование В/Ямагата-подобные
2005-2006			доминирование В/Виктория-подобных
2006-2007	В/Малайзия/2506/2004	Виктория-подобный	доминирование В/Виктория-подобных
2007-2008			только В/Ямагата-подобные
2008-2009	В/Флорида/4/2006	Ямагата-подобный	доминирование В/Виктория-подобных
2009-2010	В/Брисбен/60/2008	Виктория-подобный	только В/Виктория-подобные
2010-2011			доминирование В/Виктория-подобных
2011-2012			доминирование В/Виктория-подобных
2012-2013	В/Висконсин/1/2010	Ямагата-подобный	доминирование В/Ямагата-подобных

### 3.2 Антигенная характеристика штаммов вируса гриппа В, циркулирующего в мире в период 2003 - 2013 гг.

В 2001 году в циркуляцию вирусов гриппа В вернулись штаммы В/Викторианской ветви, подобные референс - вирусу В/Гонконг/330/01 и, с тех пор, в мире стала наблюдаться совместная циркуляция вирусов двух эволюционных линий, с доминирование одной из них в различные эпидемические сезоны.

Среди вирусов гриппа В, циркулирующих в странах Европы, Мадагаскара, Южной Кореи, Израиля, Африки в 2003-2004 гг. большинство были антигенно близки вакцинному штамму В/Шандонг/7/1997, а также референс вирусам В/Тегеран/80/2002 и В/Брисбан/32/2002, которые представляли собой штаммы - реассортанты «Victoria HA/Yamagata NA» (Tsai H., 2006) (WHO, 2003-2004).

Основное количество вирусов гриппа В, исследуемых в сезоне 2004-2005 показало близкое антигенное родство с В/Шанхай/361/2002 и В/Цзянсу/10/2003 (В/Ямагатская линия), а в 2005-2006 гг. большинство вирусов линии показывали антигенное родство с референс-штаммами. Большинство вирусов В/Викторианской линии были антигенно близкородственны референс-штамму В/Гонконг/45/2005. Однако, многие давали низкие титры в РТГА с вакцинным штаммом, выращенным на куриных эмбрионах В/Малайзия/2506/2005 (WHO, 2004-2006).

Лишь единичные случаи вируса гриппа В встречались в эпидемическом сезоне 2006-2007. Из них вирусы гриппа В/Ямагатской линии были антигенно близки референс вирусам В/Флорида/7/2004 и В/Египет/144/2005, а те, которые принадлежали В/Викторианской линии были антигенно близки с вакцинным штаммом В/Малайзия/2506/2004 (WHO, 2006-2007).

Большинство вирусов гриппа В, полученные для исследования в 2007-2008 гг. принадлежали эволюционной линии Ямагата. Однако, относительное соотношение вирусов гриппа В двух линий, выделенных в различных странах варьировало: так, к примеру, представители Викторианской линии занимали доминирующую позицию среди вирусов гриппа В, изолированных в Гонконге и

Италии (WHO, 2006-2007). Вирусы линии Ямагата были антигенно близки вакцинным штаммам В/Флорида/4/2006 и В/Брисбан/3/2007. Большинство вирусов Викторианской линии показали антигенное родство с В/Гонконг/45/2005 (В/Малайзия/2506/2004 - подобный вирус).

В РТГА большинство вирусов В/Викторианской линии, циркулирующих в сезоне 2008-2009 были антигенно близки референс - вирусу В/Гонконг/45/2005 (вирус подобный В/Малайзия/2506/2004), В/Брисбан/50/2008 и В/Брисбан/33/2008, (штаммы рекомендованные ВОЗ для включения в вакцину 2009-2010 гг.) (WHO, 2008-2009). Что касается вирусов В/Ямагатской линии, то данные РТГА показали, что многие были антигенно близки вакцинным штаммам В/Флорида/4/2006 и В/Брисбан/3/2007, в то время как другие реагировали с антисывороткой полученной против штамма В/Бангладеш/3333/2007.

По данным ВОЗ очень маленькое количество вирусов гриппа В встречалось в циркуляции в эпидемическом сезоне 2009-2010 (WHO, 2009-2010). Вирусы В/Викторианской линии давали очень слабую реакцию с пост-инфекционной сывороткой хорька против вакцинного штамма В/Брисбан/60/2008. Вирусы линии Ямагата хорошо реагировали с пост - инфекционной антисывороткой хорька, полученной против вакцинного штамма В/Флорида/4/2006.

Вирусы гриппа В/Викторианской линии в 2010-2011 году взаимодействовали с антисывороткой, полученной против штамма В/Брисбан/60/2009. Ямагатские штаммы хорошо реагировали с антисывороткой, полученной против вирусов, входящих в клайд В/Бангладеш/3333/2007 (WHO, 2010-2011).

В эпидемическом сезоне 2011-2012 гг. вирусы гриппа В В/Викторианской линии, показали антигенное родство с вакцинным вирусом В/Брисбан/60/2008, полученного на куриных эмбрионах (WHO, 2011-2012). Вирусы В/Ямагатской линии показывали низкие титры с антисывороткой против референс - вируса В/Висконсин/1/2010, но хорошо взаимодействовали с антисывороткой, полученной против референс - штамма В/Стокгольм/12/2011.

В сезоне 2012-2013 90% изученных вирусов гриппа В В/Викторианской линии показывали низкую реактивность с антисыворотками, полученными

против вакцинного штамма В/Брисбан/60/2008. Некоторые вирусы показали повышенную реактивность с антисывороткой, полученной против вирусов, у которой была найдена мутация или полиморфизм в гене НА, которые влияли на гликозилирование в аминокислотной последовательности 197 в молекуле НА1.

Вирусы В/Ямагатской линии антигенно были близки вакцинному штамму В/Висконсин/1/2010 (WHO, 2012-2013).

### **3.3. Антигенная характеристика штаммов вируса гриппа В, циркулирующих в России в период 2003 - 2013 гг.**

По антигенной структуре вирусы гриппа В Викторианской линии, циркулирующие на территории России были подобны штамму В/Гонконг/330/2001, а вирусы Ямагатской линии вакцинному штамму, рекомендованному на сезон 2004-2005 гг. В/Шанхай/361/2002 (Слепушкин А.Н. С соавт., 2006).

В России эпидемические сезоны 2005-2006 и 2006-2007 годов характеризовались распространением в мире и в России дрейф-вариантов вируса гриппа В викторианской разновидности, подобных эталонному штамму В/Малайзия/2506/2004, сменивших В/Гонконг/330/2001. По данным РТГА все штаммы Викторианской линии 2006-2007 гг. изоляции были подобны референс-штамму В/Малайзия/2506/2004 и взаимодействовали с антисывороткой к нему до 1:2-1:4 гомологичного титра, что позволяло говорить об антигенной однородности викторианских вирусов (Коновалова Н.И., 2010, Sominina A. et al., 2013).

В России в 2007-2008 гг. доминировали представители Ямагатской линии, когда на смену вирусам, подобным эталону В/Шанхай/361/2002, пришли дрейф-варианты, сходные с вирусом В/Флорида/04/2006. Антигенный анализ позволил установить относительную гомогенность всех выделенных штаммов. Вирусы были подобны референс – штамму В/Флорида/04/2006 и взаимодействовала с антисывороткой к нему до 1-1:4 гомологичного титра (Коновалова Н.И., 2010, Sominina A. et al., 2013)

Эпидемический сезон вирусов гриппа В 2008-2009 гг. в России ознаменовался возвращением в активную циркуляцию вирусов гриппа Викторианской линии, у которых произошли значимые изменения антигенных свойств. Все вирусы полностью утратили сродство с вакцинным штаммом предыдущих лет – В/Малайзия/2506/2004 и не взаимодействовали с антисывороткой к нему в РТГА. Антигенно изоляты были подобны новому эталонному штамму В/Брисбан/60/2008 и реагировали с сывороткой к этому эталонну до 1-1:2 гомологичного титра ( Коновалова Н.И., 2010, Sominina A. et al., 2013).

После пандемии 2009-2010 гг. в марте — мае 2010 года в России было изолировано небольшое количество вирусов гриппа В. Большинство из них были вирусы подобные эталонну В/Брисбан/60/08. Интересно отметить, что несколько изолятов реагировали с антисывороткой к В/Малайзия/2506/04 и В/Фуцзян-Гулоу/1272/08, что отличалось от предыдущего сезона (Sominina A. et al., 2013).

На территории России в 2010-2011 гг. вирусы гриппа В появились в циркуляции раньше, чем обычно (в декабре 2010). Все штаммы принадлежали Викторианской линии и были антигенно близки референс штамму В/Брисбан/60/08 (Sominina A. et al., 2013).

Эпидемический сезон 2011-2013 годов в России характеризовался совместной циркуляцией вирусов гриппа В Ямагатской и Викторианской эволюционных линий Викторианские штаммы по своим антигенным характеристикам были близки вакцинному штамму В/Брисбан/60/2008, а Ямагатские вирусы показывали близкое родство с эталоном В/Висконсин/1/2010 (Sominina A. et al., 2013).

#### **3.4. Молекулярно-генетическое строение НА и NA вирусов гриппа В.**

**3.4.1 Структура белка НА.** С помощью кристалльной структуры была изучена пространственная структура гемагглютиниана штамма В/Гонконг/8/1973 (Qinghua W., 2008). Было показано, что молекула вируса гриппа В состоит из двух субъединиц: НА1, которая несёт около 342 аминокислотных остатков и НА2, состоящей из 169 а.о. Каждая субъединица вируса гриппа В содержит семь

дисульфидных мостиков, двое из которых являются уникальными для вирусов гриппа В: Cys54-Cys57 и Cys178-Cys272 (Lindstrom S.E., 1999).

В структуре гемагглютинаина вируса гриппа В было выделено четыре антигеннозначимых области: петля 120 (молекула HA1 -116-137), петля 150 (HA1 - 141-150), петля 160 (HA1 - 162-167) и спираль 190 (HA1- 194-202) (Wang et al., 2008).

Петля 120 является одной из наиболее мутирующей области и частично совпадает с сайтами E у HA H3 и сайтами Sa и Sb у HA H1 (Verhoeven, M., 1983).

Вторая антигенная область представлена петлёй 150 и частично совпадает с сайтом A у HA H3 и сайт Ca у HA H1 (Berton M., 1984)

Петля 160 — это единственный регион у HA вируса гриппа В, где неоднократно были обнаружены вставки и делеции у выделенных изолятов, циркулирующих в различных эпидемических сезонах (Nakagawa N., 2003). Похоже, что вставки и делеции и замены аминокислот в этой области являются эффективными способами для вируса гриппа В варьировать и, в частности, выживать длительный период времени без антигенных шифтов, как это наблюдалось у вируса гриппа А. Петля 160 частично совпадает с сайтом В в HA H3 (Wiley, D.,1981) и с сайтом Sa в HA H1.

Спираль 190 играют также важную антигенную роль и частично совпадает с сайтом В у HA H3 и сайтом Sb у HA H1 (Caton A., 1982).

**3.4.2. Структура NA.** Молекула нейраминидазы вируса гриппа В представляет собой структуру в форме пропеллера, состоящую из 6 сильно скрученных 4-х спиральных  $\beta$ -листов. Трёхмерная структура NA показала, что она состоит из 4 областей: цитоплазматического домена, трансмембранного домена, головки и стволовой части (Burmeister P., 1992).

В головке нейраминидазы располагается активный сайт, который состоит из двух компонентов: сайта связывания сиаловой кислоты и сайт связывания иона кальция (Bossart P., 1988).

Два отдельных сайта связывания кальция располагаются на тетрамере NA.

Один сайт расположен на 4-х складчатой оси, а другой сайт находится на каждой субъединице расположенный непосредственно рядом с активным сайтом. Ион кальция первого сайта имеет восьмигранную координацию и связан четырьмя карбонилами кислорода аминокислотных остатков Asp292, Thr296, Gly343 и Gly345, одним карбоксилем кислорода остатка Asp323 и одной молекулой воды (Colman P, 1983, Burmeister P., 1991).

Второй сайт связывания кальция находится на 4-х складчатой оси и сформирован четырьмя симметрично расположенными Glu167, связанными молекулой воды.

В молекуле NA существует два потенциальных сайта гликозилирования, один из которых находится в позиции 283 (Asn283) и является специфичным для вирусов гриппа В и сайт в позиции 143, который встречается у всех типов вирусов гриппа.

Дисульфидные связи, которые участвуют в стабилизации структуры нейраминидазы у вирусов гриппа В схожи с таковыми у вирусов гриппа А, за исключением того, что у NA вирусов гриппа А существует один дисульфидный мостик (от Cys175 к Cys193), который отсутствует у вирусов гриппа В, однако нейраминидазы вируса гриппа В имеют непарный цистеин (Cys250) (Kabsch W, 1983).

### **3.5. Изменения в последовательностях НА и их влияние на свойства вирусов гриппа В, циркулировавших в мире в период 2003-2013**

Последовательности НА большинства вирусов гриппа В/Ямагатской линии, циркулировавших с 2003 по 2005 года принадлежали эталону В/Цзянсу/10/2003 (сублиния В/Харбин/7/94). Важные изменения затронули антигенную область - петля 120 - в двух позициях 123 и 129 (табл. 5) (WHO, 2003-2004). Гемагглютинины вирусов гриппа В/Викторианской линии 2004-2005 гг. по своему молекулярно-генетическому строению были наиболее близки референс - штамму В/Гавайи/13/2004 с характерными заменами K80E и A217S (Tsai H., 2006, WHO, 2004-2005).

В 2005-2007 гг. вирусы гриппа В/Ямагатской линии заменой V252M и

принадлежали клайду В/Флорида/4. Вирусы гриппа В/Викторианской линии были представлены двумя референс-штаммами В/Огайо/1/2005 с характерной заменой К80Е и В/Малайзия/2506/2004 со специфическими заменами R48E, K80R, а также K129N в петле 120 (WHO, 2006-2007).

В эпидемическом сезоне 2007-2008 ямагатские вирусы принадлежали двум сублиниям В/Брисбан/3/2007 и В/Флорида/4/06. Часть штаммов представляла собой промежуточный вариант, приобретя замены в петле 160 - N165Y, в петле 150- S150I, а также в позиции 229 - G229S (табл.5). Викторианские вирусы принадлежали клайду В/Малайзия/2506 и приобрели новую в сравнении с предыдущем сезоном замену K56Q (WHO, 2007-2008).

Большинство вирусов Ямагатской линии 2008-2009 гг. практически утратили родство с В/Флорида/4/06- подобными вирусами и принадлежали большому клайду В/Бангладеш/3333/2007, обладая характерными для него заменами (таб.5). Изменения в петле 160 – и в петле 150 , а также замена у викторианских штаммов сменила их генетическое сходство от штаммов подобных В/Малайзия/2506/04 к штаммам подобным В/Брисбан/60/08.

В 2009-2010 гг. викторианские штаммы представляли клайд В/Брисбан/60 и приобрели две новые замены в спирали 190 N197D и A202S. Вирусы В/Ямагатской линии подобные В/Бангладеш/3333/07 приобрели замену в спирали 190 – N202S (WHO, 2009-2010).

В период с 2010 по 2012 гг. штаммы вирусов гриппа В разделились на несколько генетических групп внутри клайда В/Бангладеш/3333 (В/Ямагатская линия) и В/Брисбан/60 (В/Викторианская линия) в зависимости от соответствующих аминокислотных замен. У штаммов В/Ямагатской линии была найдена замена в спирали 190 – аспарагин на серин (N197S), связанная с потерей потенциального сайта гликозилирования (WHO, 2010-2012). По данным Европейского Центра по гриппу ВОЗ (Лондон) в 2011-2012 гг. была зафиксирована циркуляция штаммов вирусов гриппа В/Викторианской линии, которые представляли собой реассортанты между клайдами внутри линии Виктория (WHO, 2011/12.)

В 2012-2013 гг. вирусы гриппа В/Ямагатской линии разделились на два отдельных клайда - В/Массачусетс/02/2012 и В/Висконсин/1/2010, отмечаясь специфическими заменами (табл.5). В последовательностях НА была найдена замена в позиции 196 в петле 190 - D196N, которая была связана с приобретением потенциального сайта гликозилирования. На основании аминокислотных замен в нескольких позициях в гене НА викторианские штаммы также разделились на генетические группы, которые принадлежали филогенетическому клайду В/Брисбан/60/08 (WHO, 2012-2013).

### **3.6. Изменения в последовательностях НА и их влияние на свойства вирусов гриппа В, циркулировавших в РФ в период 2003-2013**

В России эпидемические сезоны 2005-2006 и 2006-2007 годов характеризовались распространением в мире и в России дрейф-вариантов вируса гриппа В викторианской разновидности, подобных эталонному штамму В/Малайзия/2506/2004, сменивших В/Гонконг/330/2001 (рис.7). В последовательностях НА этих вирусов были найдены изменения, затронувшие ряд позиций. Так в петле 120 произошла замены аргинина на гистидин (R116H), аспарагин на треонин(N121T), лизин на аспарагин в 129 положении (K129N), которая сопровождалась сменой заряда аминокислоты с положительного на нейтральный. В районе 160 петли, замена глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту – E164D. Кроме этих замен, изменения затронули положения 48 и 80: K48E и K80R (Лобова Т. Г., 2012)

В России в 2007-2008 гг. доминировали представители Ямагатской линии, когда на смену вирусам, подобным эталону В/Шанхай/361/2002, пришли дрейф-варианты, сходные с вирусом В/Флорида/04/2006 (рис.8). Изоляты вирусов гриппа В характеризовавшиеся генетическими изменениями в антигенно значимых областях (150петля – замена S150I, 160 петля -N165Y) (Лобова Т. Г. , 2012)

Генетический анализ штаммов вируса гриппа В 2009-2011 гг. в России подтвердил, что все вирусы относились к викторианской линии и к В/Брисбан/60/2008-подобным штаммам (рис.7) с характерными

аминокислотными заменами (V146I, N165K) в гемагглютинине, затрагивающими антигенные области (петля 150 и петля 160) (Лобова Т. Г., 2012).

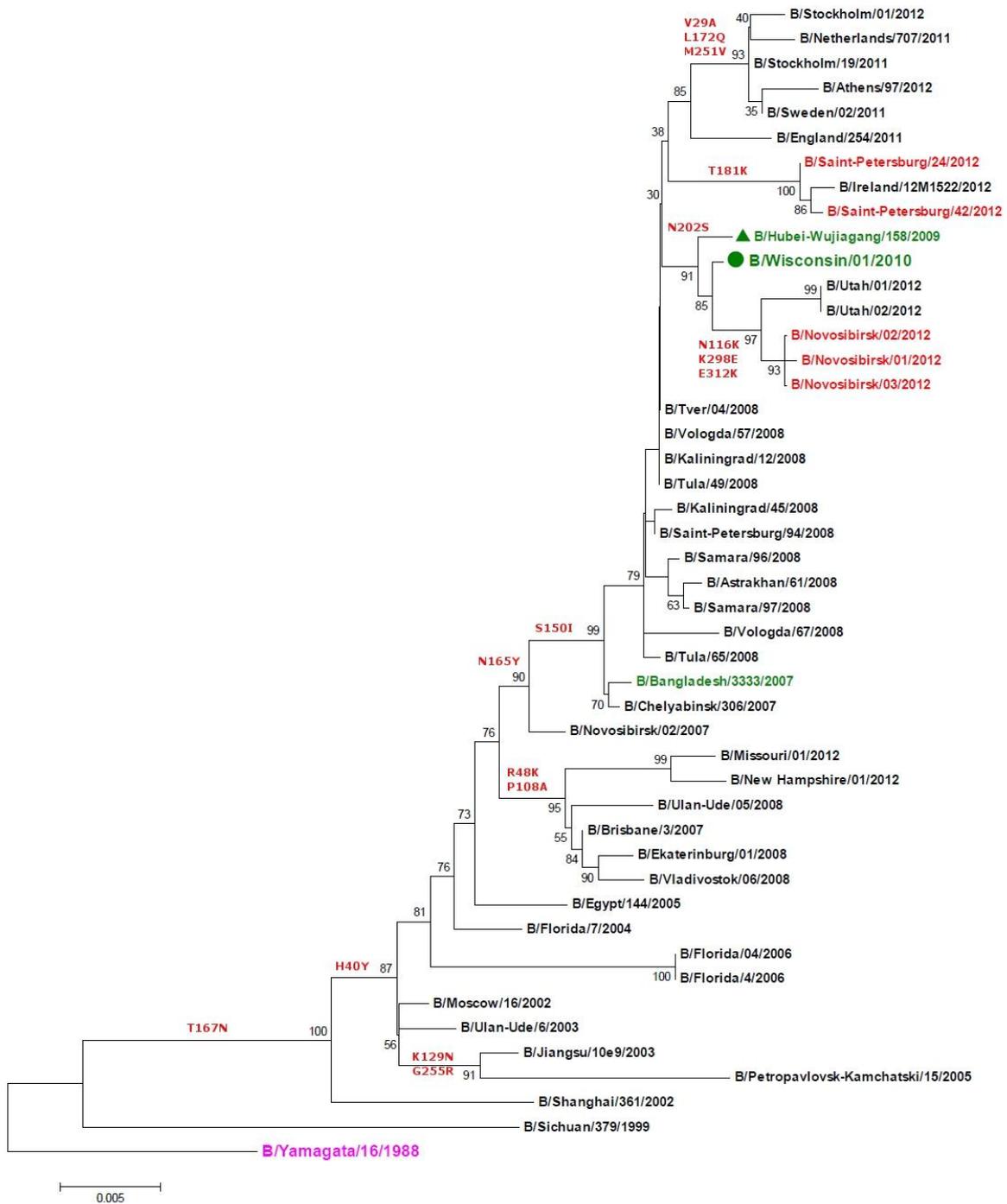
В России в сезоне 2012-2013 в НИИ гриппа г. Санкт-Петербург был зарегистрирован штамм В/Санкт-Петербург/44/2012, который относится к клайду 1В по гену НА, но по гену NA был подобен штамму В/Малайзия/2506/2004 и относится к клайду 4 с аминокислотными заменами, характерными для этого штамма – S41P, P42S, K404E, D463N, то есть данный штамм оказался межклайдовым реассортантом (рис. 7) (Писарева М.М., 2013).

**Аминокислотные изменения в последовательностях гемагглютинина вирусов гриппа В,  
циркулировавших с 2003 по 2013 гг.**

Сезон	Эталонный штамм	Петля 120	Петля 150	Петля 160	Спираль 190	Замены, связанные с потерей/приобретение потенциального сайта гликозилирования	Специфические для эталонного штамма замены
2004-2005	В/Гавай/13/2004	н/н	н/н	н/н		н/н	A217S K80E
2005-2007	В/Огайо/1/05	н/н	н/н	н/н	V190I	н/н	K80E V77I
	В/Малайзия/2506/04	K129N	н/н	н/н	н/н	н/н	R48E K80R
2007-2008	В/Малайзия/2506/2004	K129N	н/н	н/н	н/н	н/н	K56Q K48E K80R
2008-2009	В/Брисбан/60/2008	н/н	V146I	N165K		н/н	N75K S172P V225I L58P
2009-2010	В/Брисбан/60/2008	н/н	V146I	N165K	N197D A202V	н/н	K48E L58P N75K K80R S172P V225I
2010-2011	В/Гонконг/514/2009	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	N75K S172P L58P R279K
	В/Одесса/3886/2010	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	N75K S172P L58P
	В/Париж/1762/2009	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	V225I N75K S172P
	В/Англия/393/2008	н/н	V146I	н/н	н/н	н/н	N75K S172P
2011-2012	В/Одесса/3886/2010	н/н	н/н	N165K	н/н	н/н	A202E
	В/Гонконг/514/2009	N129S	н/н	N165K	н/н	н/н	N171D L58P
	В/Малта/MV636714/2011	H122N	н/н	N165K	н/н	н/н	н/н
	В/Париж/1762/2009	н/н	V146I	N165K	н/н	N197S н/н	V225I
	В/Англия/393/2008	н/н		N165K	н/н	н/н	
2012-2013	В/Малта/636714/2011	н/н	V146I	н/н	н/н	н/н	A202V, K307R
	В/Англия/393/2008	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	
	В/Формоса/V2367/2012	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	A169E
	В/Йоханнесбург /3964/2012	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	T47A
2003-2005	В/Осло/71/2004	N123S	н/н	н/н	н/н	н/н	V252M
	В/Цзянсу/10/2003	K129N	н/н	н/н	н/н	н/н	D233A G256R
2005-2006	В/Флорида/7/04		н/н	н/н	н/н	н/н	V252M
	В/Египет/144/05	н/н	н/н	н/н	н/н	н/н	P108A G230D V252M Y40H D478E
2006-2007	В/Флорида/7/2004	н/н	н/н	N166Y	н/н	н/н	M252I
2007-2008	В/Брисбан/3/2007	н/н	н/н		н/н	н/н	R48K P108A
	В/Флорида/4/2004	н/н	н/н		н/н	н/н	G229S K271R
2008-2010	В/Бангладеш/3333/2007	н/н	S150I	N165Y	н/н	н/н	M251V G229D N202S
2010-2011	В/Висконсин/1/2010	N116K	н/н	н/н	н/н	н/н	N202S D56E
	В/Бангладеш/3333/2007	T121A	A146S		н/н	н/н	G183R T181A M251V K253R
2011-2012	В/Стокгольм/12/2011	V124A	н/н	н/н	н/н	н/н	M251VV29A, L172Q
	В/Сербия/1894/2011		н/н	н/н	н/н	н/н	T181A, K253RM251V
	В/Висконсин/1/2010	N116K	н/н	н/н	н/н	н/н	N202S
2012-2013	В/Массачусетс/02/2012		н/н	н/н	н/н	н/н/D196N	R48K, P108A T181A,
	В/Висконсин/1/2010	N116K N123T Q122K	н/н	I150V	н/н	н/н D196N	N202S K298E E312K



Рис. 7. Филогенетическое сравнение последовательностей гемагглютинаина вирусов гриппа В Викторианской линии, циркулировавших в период 2005-2012 гг. (по данным Писаревой М.М.)



**Рис.8** Филогенетическое сравнение последовательностей гемагглютинаина вирусов гриппа В Ямагатской линии, циркулировавших в период 2005-2012 гг. (по данным Писаревой М.М.)

### **3.7. Изменения в последовательностях NA и их влияние на свойства вирусов гриппа В.**

Последовательности нейраминидазы вирусов гриппа В Ямагатской линии в период с 2003 по 2006 гг. принадлежали нескольким группам, входящих в сублинии Сичунь и Харбин. Отдельная группа была представлена штаммами-реассортантами, которые несли ген NA Викторианской ветви и ген NA Ямагатской ветви (таб.6) (WHO, 2003-2006).

В 2006-2008 гг. последовательности NA вирусов гриппа Викторианской линии разделились на две отдельные генетические линии В/Виктория/304/06 и В/Малайзия/2506/04. Вирусы В/Ямагатской линии 2006-2007 гг. были схожи с последовательностями NA эталонного штамма В/Флорида/7/2004, а в следующем сезоне в результате того, что в последовательностях нейраминидазы произошли изменения в позициях 125, 186 и 340 штаммы представляли генетические группы В/Флорида/4/2006 и В/Брисбан/3/2007 (WHO, 2006-2008).

В результате антигенного дрейфа в последовательностях нейраминидазы ямагатские вирусы 2008-2010 гг. приобрели замены в трёх позициях 42, 463 и 465, что позволило им эволюционно уйти от штаммов подобных В/Флорида/4/06 и образовать клайд В/Бангладеш/3333 (таб.6). Большинство последовательностей NA викторианской линии приобрели замены D329N, I204V, A358E, характерные для нового эталонного штамма В/Брисбан/60/2008. (WHO, 2008-2010).

В 2010-2012 гг. вирусы гриппа линии Ямагата разделились на несколько генетических групп представляющих клайд В/Бангладеш/3333, однако в 2012-2013 гг. ямагатские штаммы потеряли родство с эталонами и разделились на две большие филогенетические группы – В/Массачусетс/02/12 и В/Висконсин/1/10. Две замены D463N, A465T, найденные в последовательностях NA были связаны с приобретением потенциального сайта гликозилирования. Викторианские штаммы с 2010 по 2013 гг. представляли несколько генетических групп, которые располагались внутри клайда В/Брисбан/60 (таб.6) (WHO, 2010-2013, Laplante J., 2013).

Таблица 6

**Аминокислотные изменения в последовательностях нейраминидазы вирусов гриппа В,  
циркулировавших с 2003 по 2013 гг.**

Сезон	Эталонный штамм	Замены, связанные с приобретением потенциального сайта гликозилирования	Специфические для эталонного штамма замены
<b>Ямагатская линия</b>			
2003-2005	Реассортанты Vic/Yam	н/н	K373E I248V K125N S398I
	В/Цзянсу/10/2003	н/н	P42T D342N
	В/Тегеран/80/02	н/н	T389A
	В/Осло/71/04	н/н	T49I S244P D329N
2006-2007	В/Египет/144/2005	н/н	T49I S244P D329N
	В/Флорида/7/200 2004	н/н	T49I S244P D329N
2007-2008	В/Брисбан/3/2007	н/н	T68A K125T R186K T49I S244P D329N N340D
	В/Флорида/4/2006	н/н	T68A K125T R186K N340D
2008-2009	В/Бангладеш/3333/2007	D463N A465T	D463N A465T Q42R
	В/Брисбан/3/2007	н/н	K125T T68A R186K N340D
2009-2010	В/Бангладеш/3333/2007	D463N A465T	D463N A465T Q42R
2010-2011	В/Алжир/G486/2009	D463N A465T	T334A
	В/Англия/145/2008	D463N A465T	н/н
	В/Висконсин/1/2010	D463N A465T	н/н
2011-2012	В/Англия/145/2008	D463N, A465T	н/н
	В/Висконсин/1/2010	D463N, A465T	н/н
	В/Сербия/1894/2011	D463N, A465T	D53G
	В/Стокгольм/12/2011	D463N, A465T	K343E I248V L73P
2012-2013	В/Висконсин/1/2010	D463N A465T	D342N, A395T R295H A358T
	В/Массачусетс/02/2012	н/н	R65H I248V T106I, S295R
<b>Викторианская линия</b>			
2006-2008	В/Виктория/304/2006	н/н	N220KE320DE404KK125N
	В/Малайзия/2506/200 2004	н/н	S41PP42SV271ID463N
2007-2008	В/Виктория/304/2006	н/н	N220K K125NE320DE404K
	В/Малайзия/2506/200 2004	н/н	S41PP42SV271ID463N
2008-2009	В/Виктория/30 4/2006	н/н	K125NE320DE404K N220K
	В/Брисбан/60/2008	н/н	D329NI204VA358E
2009-2010	В/Брисбан/60/2008	н/н	D329NI204VA358E N220K
2010-2011	В/Одесса/3886/2010	н/н	I204VN220KK94R
	В/Гонконг/514/2009	н/н	I204VN220K N199DP51S L73F
	В/Париж/1762/2009	н/н	I204VN220KD329N A389T
	В/Англия/393/2008	н/н	I204VN220K
2011-2012	В/Одесса/3886/2010	н/н	S27L

	В/Гонконг/514/2009	н/н	P51S,L73F,N199D
	В/Малта/MV636714/2011	н/н	T49A N340D
	В/Англия/393/2008	н/н	I204V, A358E
2012-2013	В/Формоса/V2367/2012	н/н	L73F
	В/Мальта/636714/2011	н/н	D329N N340D
	В/Йоханнесбург /3964/2012	н/н	V401I S295R, E358K
	В/Англия/393/2008	н/н	D329N

### 3.7.1. Замены в последовательностях белка нейраминидазы вируса гриппа В, связанные с резистентностью к лекарственным препаратам.

В ходе активного использования антинейраминидазных противовирусных лекарственных препаратов, вирусы гриппа В приобрели замену, связанную с устойчивостью к лекарствам (Burnham A., 2014).

Каждый год в мире регистрируются единичные случаи резистентных штаммов вируса гриппа В среди пациентов, которые прошли лечение антинейраминидазными препаратами. Как правило, у таких штаммов находят замену, которая обуславливают снижение чувствительности к противовирусным препаратам: R152K в активном сайте NA, которая отвечает за резистентность как к занамивиру, так и озельтамивиру (Gubareva, L. V. 2004). Также в 2004 году был выделен штамм В/Мемфис/20/96, который оказался устойчивым к озельтамивиру и нес замену D198N в активном центре NA (Белякова Н.В., 2010, Cheam A. et al, 2004, Mishin E., et al.,2005). Таким образом самыми распространёнными мутациями в последовательностях вирусов гриппа В были две замены - R152K и D198N- ответственные за резистентность к озельтамивиру и занамивиру.

Первый и единственный случай изоляции резистентного к занамивиру штамма вируса гриппа В с мутацией R152K в нейраминидазе от ребёнка с нарушениями иммунного статуса был описан в 1998 году (Govorkova E.A., 2001, Бреслав Н.В., 2013).

По сообщениям Всемирной Организации Здравоохранения с 2003 по 2013 гг. был выявлен один случай резистентного штамма к озельтамивиру от пациента из Франции в 2012 году (WHO, 2011-2012). В России в период с 2006 по 2013 гг. все исследуемые штаммы вирусов гриппа В были чувствительны к препаратам с

антинейраминидазной активностью и мутации R152K и D198N не несли (Бреслав Н.В., 2013, Somonina A., 2013).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение вирусов гриппа А (H3N2) и В показало, что изменения в строении генов НА, NA и белка М были обусловлены антигенным дрейфом, который происходит в результате точечных мутаций в геноме и вызывал образование новых популяций вирусов гриппа. Именно мутации ответственны за возникновение новых антигенных вариантов. Под воздействием коллективного иммунитета населения происходит отбор вирусов, отличающихся по особенностям поверхностных антигенов от исходного родительского штамма (Lin Y., 2004).

Вирусы гриппа А (H3N2) и В имеют довольно высокий уровень точечных мутаций, однако мутационный уровень генов вируса гриппа В медленнее, чем тот, который наблюдается у генов вируса гриппа А (H3N2), что отразилось на общем распространении этих вирусов и уровне их коллективного иммунитета (Vyarugaba D., 2013). Эволюция вирусов гриппа А (H3N2) всегда находилась под влиянием процесса реассортации между линиями, циркулирующими в различные эпидемические сезоны (Bragstad K., 2008), в то время как вирусы гриппа В выбрали другую стратегию эволюции путём вставки и делеции нуклеотидов в последовательностях гемагглютинаина (McCullers., 1999, Nerome, R., 1998), благодаря чему они сумели закрепиться в циркуляции и смогли стать непосредственными участниками практически всех эпидемических сезонов последних двадцати лет.

Однако случаи реассортации генов между двумя эволюционными линиями, В/Ямагатской и В/Викторианской, встречались и среди вирусов гриппа В (Xu X., 2004, Barr I., 2003). Так в сезоне 2003-2004 гг. во многих странах регистрировали реассортанты, которые с одной стороны несли гемагглютинин вирусов подобных Викторианской линии, а нейраминидазу вирусов подобных

Ямагатской линии (Puzelli S., 2004). Кроме того, в последнее время стали встречаться реассортанты между клэйдами внутри Викторианской линии (WHO, 2011-2012). Появление таких реассортантов штаммов гриппа В предполагает, что они выбрали ту же стратегию эволюции, что и вирусы гриппа А (Tsai H., 2006), однако истинное значение их до конца не известно.

Появление новых актуальных вирусов гриппа А(Н3N2) и В характеризовалось постепенным вытеснением из циркуляции предыдущих антигенных вариантов, что приводило к замещению «старых» вакцинных штаммов на новые. Так, антигенный дрейф вирусов гриппа А(Н3N2), циркулирующим во всём мире в период 2003-2013 гг. носил постепенный поступательный характер, меняясь от А/Фудзянь/411/02-А/Велингтон/1/04-А/Калифорния/7/04 - А/Висконсин/67/05- А/Брисбан/10/2007-А/Перт/16/2009-А/Виктория/208/2009-А/Виктория/361/2011 с соответствующими заменами в антигенных сайтах, особенно в сайтах А и В. За последние десять лет именно эти два сайта (А и В) в молекуле НА вируса гриппа А(Н3N2) подвергаются наиболее сильному действию положительной селекции, вызывая в них наибольшее количество аминокислотных замен (Bragstad, 2008). Функциональное значение замен и их влияние на свойства вирусов активно обсуждаются, но многие из них остаются не расшифрованными.

Вирусы гриппа В/Викторианской линии, циркулирующие в различных странах мира с 2003 по 2013 гг. менялись в направлении В/Шандонг/7/97-В/Гонконг/330/01- В/Малайзия/2506/04 - В/Брисбан/60/08, а вирусы В/Ямагатской линии в направлении: В/Сычунь/379/99 – В/Шанхай/361/02 - В/Джансу/10/03 – В/Флорида/4/06 – В/Бангладеш/3333/07 – В/Висконсин/1/10. В результате антигенного дрейфа, который приводил к смене эталонных вирусов, изменения затрагивали антигеннозначимые области в гемагглютинине вирусов гриппа В. Две области испытывали наибольшее количество изменений: петля 150 и петля 160.

В последние несколько лет у вирусов гриппа А (Н3N2) и В появлялись аминокислотные замены, связанные с появлением дополнительных сайтов

гликозилирования (например, замены S45N, D122N в гемагглютинине вируса гриппа А (H3N2) или замены A465T, D463N в нейраминидазе вируса гриппа В) или с утратой потенциального сайта гликозилирования (замена T128A в HA H3N2 или N197S в HA вируса гриппа В) (WHO, 2011-2012). Наличие таких замен показало, что у вирусов гриппа А (H3N2) и В появился ещё один общий механизм, с помощью которого происходит добавление или удаление сайтов гликозилирования, что позволяет вирусам регулировать свою антигенную изменчивость.

Таким образом, вышеперечисленные факты определяют круг проблем, которому посвящена данная работа: для изучения эволюционных свойств вирусов гриппа А(H3N2) и В мы выбрали три белка - гемагглютинин, который представляет собой рецептор - связывающий белок и является главной мишенью иммунного ответа, и поэтому является наиболее варибельным белком у вирусов гриппа — аминокислотные замены в антигенных сайтах в молекуле гемагглютинина оказывают влияние на антигенные свойства вирусов гриппа, что приводит к смене вакцинных штаммов; нейраминидазу и белок М, так как именно в этих двух белках были найдены замены, связанные с устойчивостью вирусов гриппа к противовирусным препаратам. Важной задачей было установить соответствие изучаемых нами штаммов с вакцинными штаммами, а также разработать или усовершенствовать молекулярно-генетические методы для детекции, дифференцирования вирусов гриппа, с возможностью отслеживать значимые аминокислотные замены, влияющие на свойства изучаемых штаммов вирусов гриппа для более полного понимания эволюционной картины вирусов гриппа А(H3N2) и В, циркулирующих на территории России.

## **РАЗДЕЛ 2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.**

### ***ГЛАВА 1. Материалы и методы***

#### **1.1 Эпидемические штаммы вирусов гриппа.**

В исследование были включены 122 эпидемических штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, циркулировавших в России в период с 2003 по 2013 гг., в том числе: изолированных от пациентов поступивших в Инфекционную клиническую больницу №1 г. Москвы и выделенных в лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» г. Москвы; в вирусологических лабораториях ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии» гг. Ярославля, Липецка, Томска, Великого Новгорода, Владимира (официальные базы Центра этиологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ) НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Минздрава РФ), а также в вирусологических лабораториях ряда городов России (Ярославль, Липецк, Москва, Омск, Пермь, Рязань, Томск, В. Новгород, Хабаровск, Н. Новгород, Екатеринбург, Якутск, Владимир, Астрахань, Краснодар, Владивосток, Самара, Оренбург, Чебоксары, Биробиджан, Тверь), представивших клинический материал/изоляты в ЦЭЭГ в период с 2003 по 2013 гг. Из числа изученных штаммов 70 штаммов принадлежали вирусу гриппа А(Н3N2) и 52 штаммов - вирусу гриппа В. При выборке учитывали особенности их антигенных свойств и географического распространения в период 2003-2013гг. (табл.1).

Таблица 1

Репрезентативность штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, циркулировавших в период с 2003-2013 гг.

Эпидемические сезоны	Штаммы вирусов гриппа, включенных в исследование			
	А(Н3N2)	Город, количество изученных штаммов	В	Города, количество изученных штаммов
2003-2004	10	Ярославль-2 Липецк-1 Москва-1 Омск -1 Пермь -1 Рязань-1 Томск-1 Великий Новгород-1 Хабаровск-1	4	Ярославль-1 Хабаровск-1 Москва-1 Нижний Новгород-1
2004-2005	2	Ярославль-1 Москва-1	5	Рязань-1 Хабаровск-1 Москва-2 Ярославль-1
2005-2006	1	Екатеринбург-1	1	Якутск-1
2006-2007	4	Владимир-2 Ярославль-1 Москва-1	4	Астрахань-1 Краснодар-1 Липецк-1 Н. Новгород-1
2007-2008	9	Астрахань-2 Владивосток-3 Якутия-2 Екатеринбург-1 Пенза -1	8	Астрахань-2 Нижний Новгород-1 Оренбург-2 Томск -1 Владивосток -1 Самара-1 Оренбург-1
2008-2009	7	Москва-4 Липецк-3	2	Москва-2
2009-2010	0	Не циркулировал	4	Москва-4
2010-2011	8	Владивосток-8	5	Москва-3 Оренбург-2
2011-2012	16	Чебоксары-2 Оренбург-3 Москва-7 Липецк -1 Владивосток-1 Ярославль-1 Томск-1	3	Владивосток-1 Биробиджан-2
2012-2013	13	Москва-6 Томск-6 Тверь-1	17	Москва-4 Томск-1 В. Новгород-1 Ярославль-1
<b>Всего</b>	<b>70</b>		<b>52</b>	

## **1.2 Методы изучения антигенных свойств штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и В.**

### **1.2.1 Изоляция эпидемических штаммов вирусов гриппа**

Штаммы вирусов гриппа А(Н3N2) и В были выделены при заражении носоглоточными смывами монослоя клеток культуры ткани MDCK по методу Davies HW с соавт. с добавлением в поддерживающую среду TPCK-treated trypsin XIII fraction, Sigma, в конечной концентрации 2,0 мкг/мл., согласно рекомендации ВОЗ (16).

Штаммы, циркулирующие в период с 2003 по 2009 гг. были получены из коллекции вирусов лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ.

### **1.2.2. Изучение антигенных свойств вирусов гриппа**

Антигенную структуру выделенных штаммов определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием эталонных штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В и подготовленным к ним специфических высокоиммунных сывороток (табл.2) (17).

Эталоны вирусов гриппа были получены из сотрудничающих с ВОЗ Международных центров по гриппу — National Institute of Medical Research (NIMR), Лондон, Великобритания и Центров по контролю за заболеваемостью и профилактики (CDC&P), Атланта, США.

Поликлональные крысиные сыворотки были получены из коллекции лаборатории экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ, а также диагностических наборов ВОЗ для типирования эпидемических штаммов, получаемых в рамках Международного сотрудничества как Национальный центр по гриппу.

Таблица 2

**Список эталонных штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, использованных для изучения антигенных свойств в период с 2003 по 2013 гг.**

Штаммы вируса гриппа А(Н3N2)	Вирус гриппа В	
	Название штамма	Принадлежность к эволюционной линии
А/Москва/10/99	В/Сичунь/379/99	Ямагатская
А/Панама/2007/99	В/Шанхай/361/02	Ямагатская
А/Кумамото/102/02	В/Гонконг/330/01	Викторианская
А/Висконсин/67/05	В/Флорида/04/06	Ямагатская
А/Брисбан/10/07	В/Малайзия/2506/04	Виктория
А/Перт/16/09	В/Брисбан/60/08	Виктория
А/Виктория/361/11	В/Висконсин/1/10	Ямагатская

### **1.3 Методы изучения молекулярно-генетических свойств эпидемических штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В**

#### **1.3.1. Выделение вирусной РНК из исследуемого материала**

Вирусную РНК выделяли из штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, предварительно изученных по антигенным свойства, с помощью наборов Viral RNA Kit, Рибо-преп (вариант 100) и Проба-НК, согласно инструкции производителя (табл.3)

Таблица 3

#### **Тест-системы для выделения РНК**

Название набора	Фирма-производитель
Viral RNA Kit	Zymo Reseach
Рибо-преп (вариант 100)	Amplisens Biotechnologies
Проба-НК	ДНК-Технологии

### 1.3.2. Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию проводили набором «Реверта-L» (Amplisens Biotechnologies), согласно инструкции производителя в амплификаторе (Rotor Gene) или в термостате «Гном» при 37 °С 30 минут. Также использовали ПЦР смесь в объёме 20 мкл: 4 мкл 5xbuffer (Bio-Rad), 0,5 мкл dNTPs, 1 мкл праймера 5'Uni (AGCRAAAGCAGG), 4 мкл H<sub>2</sub>O, 0,5 мкл обратной транскриптазы MMLV (Promega, USA) и 10 мкл вирусной РНК и реакцию проводили в термостате на 30 минут при 42 °С.

### 1.3.3 Тест-системы для детекции вирусов гриппа А(Н3N2) и В методом ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)

Для детекции вирусов гриппа А(Н3N2) и В методом ОТ-ПЦР-РВ использовали коммерческие тест-системы («АмплиСенс® Influenza virus А-тип-FL», «АмплиСенс® Influenza virus А и В-тип-FL», «Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации кДНК нейраминидазы N2 вирусов гриппа А(Н3N2)»). ОТ-ПЦР-РВ ставили согласно инструкции производителя (табл.4).

Таблица 4

Тест-системы для детекции вирусов гриппа А(Н3N2) и В методом ОТ-ПЦР-РВ

Название тест-системы	Фирма-производитель	Прибор
АмплиСенс® Influenza virus А-тип-FL	Amplisens Biotechnologies	Rotor Gene
АмплиСенс® Influenza virus А и В-тип-FL	Amplisens Biotechnologies	Rotor Gene
Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации кДНК нейраминидазы N2 вирусов гриппа А(Н3N2)	ДНК-Технологии	ДТ-96

### 1.3.4. Тест-системы для определения принадлежности штаммов вируса гриппа В к эволюционным линиям (табл.5)

Сотрудниками компании ООО «ДНК-технология», г.Москва (Д.Д. Абрамов и

др.) была разработана тест-система для дифференциации вируса гриппа В на две эволюционные линии (В/Yamagata/16/1988-подобных и В/Victoria/2/87-подобных) использовали «Комплект реагентов для дифференциации эволюционных линий гриппа В», ДНК-технология, г.Москва, которая основана на методе выявления специфических последовательностей в гене гемагглютинаина. ОТ-ПЦР-РВ проводили с программой амплификации: 80 °С 2 мин. и 94 °С 5 мин.– 1 цикл, 94 °С 30 сек. и 67 °С – 5 циклов, 94 °С 5 сек. и 67 °С 5 сек. – 45 циклов, 25 °С 30 сек.- 1 цикл, 25 °С 15 сек. - 50 циклов на приборе DT-light 4, руководствуясь инструкциями, предложенными в комплекте к тест-системе.

### **1.3.5. Модифицирование лабораторного варианта тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий гриппа В**

Лабораторный вариант тест-системы для дифференциации штаммов вируса гриппа В, принадлежащих к разным эволюционным линиям, был модифицирован на основе ПЦР в реальном времени с использованием двух зондов (IBNVpr и IBHVpr), меченных красителями FAM и HEX, специфических к линиям В/Victoria-подобных и В/Yamagata-подобных соответственно.

**Таблица 5**

**Тест-системы для дифференциации вируса гриппа В**

Название тест-системы	Фирма-производитель	Прибор
Комплект реагентов для дифференциации эволюционных линий гриппа В (ДНК-технологии)	ДНК-Технологии	ДТ-лайт 4
Лабораторный вариант собственной тест-системы	Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского	S 1000 Thermo Cycler(Bio-Rad)

### **1.3.6. Пробоподготовка**

Полимеразная цепная реакция проводилась со специфическими

олигонуклеотидными праймерами на амплификаторах С 1000 Thermo Cyclер (BIO-RAD) и S 1000 Thermo Cyclер (BIO-RAD)).

ПЦР смесь использовали в объёме 25 мкл: 12,5 мкл GoMM(Go Master Mix), 9 мкл H<sub>2</sub>O, по 1,0 мкл 10 pmol специфических прямых и обратных праймеров (см. Результаты и Обсуждение) и 2,5 мкл кДНК.

Электорофоретический анализ ПЦР-продуктов проводили в 1% агарозном геле (Agarose NA, Pharmacia, Германия), содержащий этидий бромида для визуализации ПЦР продукта. Результаты выявляли и документировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм при помощи трансиллюминирующей системы «Viber Lourmat» (Германия). Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путём сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров - фрагментов ДНК известной молекулярной массы - 100 bp ДНК-маркером (лаборатория Медиген).

Положительные по результатам электрофореза пробы очищали набором DNA gel extraction Clean Up(АхуGen) или набором АхуPrep PCR Cleanup Kit, 250 шт (Ахуgen). Амплификацию проводили на приборе С 1000 Thermo Cyclер (BIO-RAD) с режимом 96 °С 1 мин., 96 °С 10 сек., 50 °С 5 сек., 60 °С 4 мин., 25 циклов. ПЦР смесь готовили в объёме 10 мкл: 1,5 мкл 5 x buffer, 5 мкл H<sub>2</sub>O, 1 мкл 3,3 pmol обратного или прямого праймера(см. Результаты и Обсуждение) ,1 мкл BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing RR-100 и 2 мкл фрагмента. Фрагменты очищали ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit или методом переосаждения с использованием раствора для осаждения: 3 мл ацетата Na (2M), 2 мл 0,5 M ЭДТА (pH 8,0), 10 мл воды.

**1.3.7. Определение нуклеотидных последовательностей генов НА, NA, М** осуществляли на автоматическом секвинаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) по методу Сэнгера при помощи прямого секвенирования ПЦР-продукта с использованием реагентов BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing RR-100 согласно инструкциям изготовителя.

Для выравнивания и анализа нуклеотидных и соответствующих им

аминокислотных последовательностей использовали пакет прикладных программ Lasergene Core Suite (DNASTAR Inc.,USA) и Mega 5.2. (103).

### **1.3.8. Построение филогенетических дендрограмм**

Для построения алайментов использовали алгоритм Align by Clustal W из пакета программ MEGA 5.2 . Филогенетический анализ осуществляли на основе алгоритмов «ближайшего соседа» (Construct/Test Neighbor-Joining Tree) и «максимального схожести» (Maximum Likelihood Tree) в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры с последующим 1000-кратным ресэмплингом с помощью программ MegAlign ((DNASTAR Inc.,USA) и Mega 5.2 (175).

## ***ГЛАВА 2. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А(Н3N2) циркулировавших на территории России с 2003 по 2013 гг.***

### **2.1 Активность вируса гриппа А(Н3N2) как этиологического агента эпидемических подъемов заболеваемости в период 2009-2013гг. и его антигенные свойства**

В отличие от предыдущих лет появление в 2009г. в активной циркуляции пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 изменило долевое участие штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) в эпидемическом процессе в РФ (табл.6).

Штаммы вируса гриппа А(Н3N2) не детектировали ни одним из методов в сезоне 2009-2010гг., в тоже время его долевое участие, по данным ЦЭЭГ, в последующие сезоны было различным не только по активности, но и географическим особенностям циркуляции.

В 2010-2011гг. штаммы вируса гриппа А(Н3N2) социркулировали с А(Н1N1)pdm09 и В, но значительно уступали им по долевого участию; согласно данным ПЦР диагностики, полученным в ЦЭЭГ и на территориях опорных баз ЦЭЭГ, частота положительных проб на вирусы гриппа составила - 0,9%, 21,9%, 4,6% соответственно. В тоже время, их активность была наиболее высокой на

Дальнем Востоке; все штаммы вируса гриппа А(Н3N2) были выделены в г.Владивостоке. Детальное типирование 32 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) определило родство 29 из них с вакцинным вирусом - А/Перт/16/09 (Н3N2).  
Только

Таблица 6

**Частота детекции положительных случаев гриппа А(Н3N2) в клиническом материале (суммарные данные лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа и опорных баз ЦЭЭГ) в период 2009-2013гг.**

Методы детекции вируса гриппа А(Н3N2)	Детекция положительных случаев гриппа А(Н3N2) в клиническом материале (абс. (%) / число образцов)			
	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013
ОТ-ПЦР-РВ	0	95 (0,9) / 10 730	733 (10,0) / 7315	782 (7,0) / 11 142
Изоляция штаммов	0	46 (1,7) / 2760	175 (8,7) / 2008	159 (8,0) / 1986
Долевое участие в структуре вирусов гриппа (абс. (%) / число случаев гриппа)	0	95 (3,3) / 2913	733 (72,0) / 1023	782 (34,0) / 2313

3 штамма представляли собой его антигенные варианты, и взаимодействовали со специфической сывороткой к эталону до 1/8 гомологичного титра.

В 2011-2012гг. вирус гриппа А(Н3N2) также социркулировал с А(Н1N1)pdm09 и В и доминировал в структуре вирусов гриппа; по данным ПЦР диагностики, частота положительных проб составила 10,0%, 0,2% и 3,7% соответственно. Их активность была высокой на всех территориях опорных баз ЦЭЭГ, в том числе и в г.Владивостоке. Штаммы были выделены в гг. Москве (ЦЭЭГ), Липецке, Ярославле, Чебоксарах, Оренбурге, Томске и Владивостоке. Детальное типирование 115 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) определило их родство с эталоном А/Перт/16/2009 (Н3N2): специфическая сыворотка подавляла

гемагглютинирующую активность большинства штаммов (76%) до 1 - 1/2 гомологичного титра; 23% штаммов взаимодействовали с сывороткой к А/Перт/16/2009 (H3N2) до 1/4 гомологичного титра и только 2 штамма – до 1/8 гомологичного титра.

В 2012-2013гг. штаммы вируса гриппа А(H3N2) также социркулировали с А(H1N1)pdm09 и В, при этом, по данным ПЦР диагностики, их доленое участие составило - 7,0%, 9,3% и 4,5% соответственно. Их активность регистрировали на всех территориях опорных баз ЦЭЭГ, однако наиболее активно – на Дальнем Востоке. Штаммы были выделены в гг. Москве (ЦЭЭГ), Владимире, Томске и Владивостоке. Результаты детального типирования 108 штаммов вируса гриппа А(H3N2) показали, что популяция на 88% была близкой по родству с эталонным вирусом - А/Виктория/361/2011, при этом только 6 (5,5%) штаммов отличались более чем на 1/16 от гомологичного титра эталона.

Таким образом, вирус гриппа А(H3N2) доминировал в структуре вирусов гриппа только в одном из последних четырех сезонов (2012-2013гг.), составив в их структуре 72,0%. По антигенным свойствам популяция циркулировавших штаммов была близкородственной эталонным вариантам А/Перт/16/2009 и А/Виктория/361/2011, которые входили в состав гриппозных вакцин в соответствующие сезоны.

## **2.2. Характеристика штаммов вируса гриппа А(H3N2), выделенных на отдельных территориях РФ в 2003-2013гг. и отобранных для проведения молекулярно-генетического анализа**

Одна из задач настоящего исследования заключалась в подборе репрезентативной выборки штаммов вирусов гриппа А(H3N2), циркулировавших в РФ в период 2003-2013гг., для изучения их эволюционной изменчивости. Для отбора штаммов были выбраны следующие критерии: эпидемический сезон, географическое распространение, степень ингибирования специфической сывороткой эталонного вируса (отношение к гомологичному

титру). В исследование были включены 70 штаммов, выделенных в период 10 последних эпидемических сезонов (табл.7).

Таблица 7

**Характеристика штаммов вируса гриппа А(Н3N2), отобранных для проведения молекулярно-генетических исследований**

Эпидемический сезон	Штаммы вируса гриппа А(Н3N2)	Отношение титра ингибирования сывороткой эталона к гомологичному титру	Эталонный Штамм
2003-2004	А/Великий Новгород/73/2003	1:2	А/Панама/2007/1999
	А/Ярославль/54/2003	1:4	
	А/Пермь/116/2003	1:1	
	А/Москва/211/2003	1:1	
	А/Ярославль/4/2004	1:1	
	А/Рязань/24/2004	1:1	
	А/Омск/21/2004	1:2	
	А/Липецк/202/2003	1:1	
	А/Томск/27/2004	1:2	
2004-2005	А/Ярославль/13/2005	1:2	А/Кумамото/102/2002
	А/Москва/7/2005	1:1	
2005-2006	А/Екатеринбург/1/2006	1:1	
2006-2007	А/Ярославль/127/2007	1:2	А/Висконсин/67/2005/ А/Брисбан/10/2007
	А/Владимир/84/2007	1:1	
	А/Владимир/7/2007	1:1	
	А/Москва/39/2007	1:1	
2007-2008	А/Владивосток/4/2008	1:1	А/Висконсин/67/2005/ А/Брисбан/10/2007
	А/Владивосток/10/2008	1:1	
	А/Владивосток/6/2008	1:1	
	А/Астрахань/2/2008	1:16/ 1:4	
	А/Владивосток/19/2008	1:8/ 1:1	
	А/Астрахань/48/2008	1:4 /1:2	
	А/Пенза/55/2008	1:2/1:4	
	А/Якутия/83/2008	1:4/1:1	
	А/Якутия/85/2008	1:1/1:4	
А/Екатеринбург/4/2008	1:2/1:4		
2008-2009	А/Москва/21/2009	1:32/1:8	
	А/Липецк/228/2009	1:4/1:4	

	А/Липецк/303/2009	1:4/1:4	
	А/Москва/24/2009	1:8/1:4	
	А/Липецк/321/2009	1:16/1:4	
	А/Липецк/225/2009	1:4/1:2	
	А/Москва/26/2009	1:8/1:8	
	А/Москва/30/2009	1:32/1:1	
2010-2011	А/Владивосток/1/2010	1:1	А/Перт/16/2009
	А/Владивосток/2/2010	1:1	
	А/Владивосток/3/2010	1:1	
	А/Владивосток/4/2010	1::2	
	А/Владивосток/10/2010	1:1	
	А/Владивосток/11/2010	1:2	
	А/Владивосток/4/2011	1:1	
	А/Владивосток/10/2011	1:2	
2011-2012	А/Оренбург/39/2012	1:2	А/Перт/16/2009
	А/Оренбург/46/2012	1:4	
	А/Оренбург/50/2012	1:4	
	А/Москва/23/2012	1:1	
	А/Москва/08/2012	1:1	
	А/Москва/10/2012	1:1	
	А/Москва/02/2012	1:1	
	А/Москва/03/2012	1:1	
	А/Липецк/117/2012	1:1	
	А/Чебоксары/40/2012	1:4	
	А/Чебоксары/18/2012	1:1	
	А/Томск/52/2012	1:1	
	А/Ярославль/81/2012	1:1	
	А/Москва/07/2012	1:1	
	А/Москва/14/2012	1:1	
А/Владивосток/3/2012	1:4		
2012-2013	А/Томск/12/2013	1:8	А/Виктория/361/2011
	А/Томск/13/2013	1:16	
	А/Томск/08/2013	1:32	
	А/Томск/07/2013	1:16	
	А/Томск/05/2013	1:16	
	А/Москва/38/2013	1:4	
	А/Москва/39/2012	1:1	
	А/Тверь/135/2013	1:1	
	А/Москва/83/2013	1:8	
	А/Москва/102/2013	1:8	
	А/Москва/103/2013	1:4	
	А/Томск/04/2013	1:16	

Таким образом, исследуемые нами штаммы, которые были подобраны по своим антигенным свойствам за 10 эпидемических сезонов, отражали изменчивость вируса гриппа А(Н3N2) по антигенным свойствам и принадлежали к шести эталонным вариантам: А/Панама/2007/1999, А/Кумамото/102/2002, А/Висконсин/67/2005, А/Брисбан/10/2007, А/Перт/16/2009 и А/Виктория/361/2011.

### **2.3 Молекулярно-генетический анализ гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2)**

#### **2.3.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2)**

Задача настоящего раздела работы заключалась в разработке стратегии секвенирования полноразмерных последовательностей генов НА штаммов вируса гриппа А(Н3N2). Для этого было необходимо подобрать набор универсальных праймеров для амплификации и последующего секвенирования. Последовательности олигонуклеотидных праймеров подбирали при помощи программы Primer Select из пакета компьютерных программ DNASTAR (Lasergene, США) с использованием нуклеотидных последовательностей вирусов гриппа А(Н3N2) и В из банков данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) и ISD (Influenza Sequence Database, [www.flu.lanl.gov](http://www.flu.lanl.gov)).

Длина 4 сегмента, который кодирует белок НА составляет в среднем 1742-1778 (н.о.). Нашей задачей было получить полноразмерные последовательности гемагглютинина: для первого раунда амплификации НА вируса гриппа А(Н3N2) мы выбрали три пары праймеров – три прямых праймера (forward - F) и три обратных (reverse - R) (таб. 11).

Места посадки праймеров были выбраны на наиболее консервативные участки, путём сравнения в программе MegaLine (Lasergene, США) последовательностей НА разных штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) нескольких стран, полученных из GenBank. Прямые праймеры несли универсальные

нуклеотидные последовательности, которые были комплементарны праймеру M13F, а обратные праймеры несли последовательности комплементарные праймеру M13R. Схема расположения праймеров приведена на рисунке 2. Согласно предложенной схеме для проведения полного молекулярно-генетического анализа последовательности НА осуществляли nested амплификацию 3 отдельных перекрывающихся участков с помощью набора из 6 праймеров. Первая пара праймеров (-24) F- 800R была определена на начало сегмента и с помощью неё снимался фрагмент длиной  $\approx 800$  н.о., с помощью второй пары праймеров 565F-1205R снимала середину фрагмента  $\approx 640$  н.о., третья пара 1031F-1738R была подобрана на конец сегмента и с неё амплифицировался отрезок  $\approx 707$  н.о.

Таблица 8

**Праймеры первого раунда ПЦР для амплификации НА вируса гриппа А(Н3N2)**

Название праймера	Последовательность праймера
800R	5'-caggaaacagctatgaccGTCTCCCGGTTTTACTATTGTCCA-3'
1738R	5'-caggaaacagctatgaccTAATGCACT CAAATG CAAATGTT-3'
1205R	5'-caggaaacagctatgaccTTGGTTGATTGCTGCTTGAGTGCT-3'
(-24)F	5'-tgtaaacgacggccagt-AAGCAGGGGAGAATTCTATTAACC-3'
565F	5'-tgtaaacgacggccagtRYTGAACGTGACTATGCCAAA-3'
1031F	5'-tgtaaacgacggccagtAGGGATGCGRAATGTACCAGAGAA-3'

Для второй стадии ПЦР были подобраны универсальные праймеры – прямой (forward) M13F и обратный (reverse) M13R (таб.7), которые представляли собой нуклеотидные последовательности, комплементарные нуклеотидным последовательностям, несущим использованные в первом раунде праймеры.

### Универсальные праймеры для второго раунда ПЦР

Название праймера	Последовательность праймера
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC

Таким образом, праймеры M13F и M13R длиной 17-18 н.о. гибридизовались с комплементарными областями на ампликонах, полученных в первом раунде ПЦР и инициировали синтез цепи, комплементарной матрице (рис. 2).

Полученные в ходе реакции секвенирования три фрагмента складывались в единую последовательность в программе SeqMan ((DNASTAR Inc.,USA), что позволило провести дальнейший молекулярно-генетический анализ гена гемагглютинина.

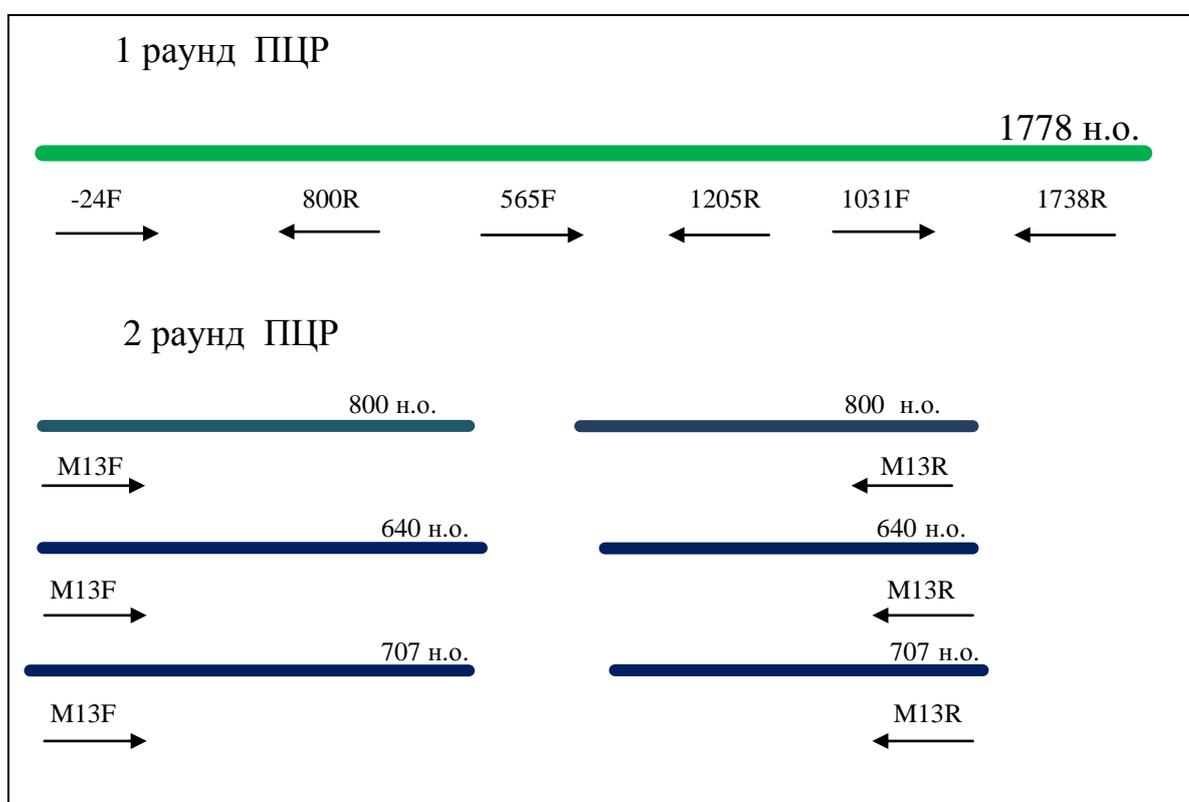


Рис. 2. Подбор праймеров для амплификации гемагглютинина вируса гриппа А(Н3N2)

### **2.3.2 Анализ аминокислотной последовательности гемагглютинина эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2), циркулировавших в 2003-2013гг.**

Для сравнения последовательностей генов HA изучаемых штаммов были использованы последовательности эталонных/вакцинных штаммов вируса гриппа А(H3N2), выделенных в других странах мира и полученных из базы данных GenBank.

За этот период мы отметили много общих, а также несколько уникальных замен в последовательностях молекул HA. Как показали наши исследования, у четырёх штаммов, выделенных в 2003-2004гг., регистрировали замены в антигеном сайте В, в позициях 159 - тирозин на фенилаланин (Y159F), 189 - серин на аспарагин (S189N), 193 – серин на фенилаланин (S193F) и в 227 позиции - серин на пролин (S227P). Из перечисленных выше четырёх замен три (Y159F, S189N и S227P) были характерны для вирусов подобных референс-штамму А/Велингатон/1/04, циркулировавших в период с 2003 по 2005 гг. В глобулярной части HA1 у штамма А/Великий Новгород/73/2003 была найдена замена в позиции 216: аспарагина на серин в позиции 216 (N216S), а у штамма А/Омск/21/2004 в позициях 217- изолейцина на валин (I217V) и 410-глутаминовая кислота на аспарагиновую кислоту (E410D). Наряду с этим часть штаммов, циркулировавших в конце 2003г. (А/Великий Новгород/73/2003, А/Пермь/116/2003, А/Хабаровск/97/2003) несли замену в позиции 479 - глицина на глутаминовую кислоту (G479E) в молекуле HA2. У вирусов, циркулировавших в сезонах 2004-2005гг. и 2005-2006гг. мы отметили общие замены, которые встречались в последовательности HA эталонного штамма А/Калифорния/7/2004 и затронули как глобулярную часть HA в позициях 226- валин на изолейцин (V226I) , 227 – серин на пролин (S227P), так и входящие в её состав антигенные сайты А в позиции 145 – лизин на аспарагин (K145N), и В в позициях 159 – (Y159F), 193 (S193F), 189 (S189N). В следующем сезоне 2006-2007 гг. у исследуемых нами штаммов общие мутации встречались в трёх антигенных сайтах: в сайте А в позиции 142 - замена аргинина на глицин(R142G) и 140-

замена лизина на изолейцин (K140I), в сайте В в позиции 193 - серина на фенилаланин (S193F) и в сайте D в позиции 173 - аргинин на глутаминовую кислоту (R173E), а также в субъединице HA1 в трёх позициях: 50 – глицин на глутаминовую кислоту (G50E), 128 – треонин на аланин (T128A), 225 – аспарагиновая кислота на аспарагин (D225N). Все вирусы несли генетические маркёры S193F и D225N, свойственные эталонному штамму А/Висконсин/67/05. Однако, наряду с этим, найденные у всех штаммов замены K140I и G50E, свойственные эталону А/Брисбан/10/07, у штамма А/Висконсин/67/05 не были найдены. У штамма А/Ярославль/127/2007 замены затронули глобулярную часть молекулы HA в позициях 42 – лейцин на метионин (L42M), 91- серин на изолейцин (S91I) и субъединицу HA2 в позиции 501 – глутамин на гистидин (Q501H), в то время как штамм А/Владимир/7/2007 нёс замену в позиции 6 – аспарагин на изолейцин (N6I) и в 91 (S91I). Все вирусы следующего сезона 2007-2008 несли характерные генетические маркёры G50E и K140I, свойственные для вирусов близко родственных эталонному штамму А/Брисбан/10/07. В молекуле HA1 изменения встречались в позициях: 50 (G50E), 57 – глутамин на гистидин (Q57H), 182 - валин на изолейцин (V182I), 291 – аспарагиновая кислота на аспарагин (D291N), а в антигенных сайтах А и В изменения затронули позиции 140 (K140I) и 157 – лейцин на серин (L157S), соответственно. Молекула HA2 отмечалась общей для всех изолятов заменой в позиции 361 - аргинин на изолейцин (R361I). У штамма А/Пенза/55/2008 произошло изменение в сайте D в позиции 173 – лизин на глутаминовую кислоту (K173E), у штаммов А/Екатеринбург/4/2008 и А/Владивосток/4/2008 изменения затронули последовательность молекулы HA1 в позициях 124 – серин на аргинин (S124R) и 290 – аспарагин на лизин (N290K). У штамма А/Астрахань/48/2008 мы отметили замену в молекуле HA2 в позиции 325 – глутаминовая кислота на лизин (E325K). Выделенные нами изоляты 2008-2009 гг. имели общие замены, которые являются генетическими маркёрами эталонного штамма А/Брисбан/10/07, в сайте А в позиции 140 (K140I) и в глобулярной части HA в позиции 50 (G50E). Наряду с этими заменами, в

антигеном сайте D в позиции 173 появилась новая мутация - лизин на глутамин (K173Q), которая была характерна для эталонного штамма А/Перт/16/09. Кроме того, все исследуемые изоляты несли замену в позиции 10 – треонин на метионин (T10M). Наибольшим разнообразием аминокислотных замен отличался дрейф-вариант А/Москва/24/2009, который помимо общих со всеми вирусами замен, нес индивидуальные в нескольких позициях: 162 – пролин на серин (P162S), 189 – аспарагин на лизин (N189K), 157- лейцин на серин (L157S) в сайте В, в позиции 79 – фенилаланин на лейцин в сайте Е и в позиции 260 – изолейцин на метионин (I260M), 261 – аргинин на глутамин (R261Q) в молекуле HA1. Интересно отметить, что замены R261Q, I260M и P162S, как правило, встречаются вместе и являются ключевыми заменами вирусов, близкородственных эталонному штамму А/Перт/16/2009. В сезоне 2010 – 2011 гг. исследуемые нами штаммы вируса гриппа А(Н3N2) были получены из восточной части страны из Владивостока и отмечались большим разнообразием аминокислотных замен. Они несли общие изменения в четырёх антигенных сайтах (А, В, D и Е) в следующих позициях: в сайте А в позициях 140 – лизин на глутамин (K140I), 144 – аспарагин на лизин (N144K), 145 – аспарагин на серин (N145S), в сайте В в позициях 158 – лизин на аспарагин (K158N), 162 (P162S), 189 (N189K), 261 (R261Q), 194 – пролин на лейцин (P194L), в сайте D в позиции 173 – лизин на глутамин (K173Q), в сайте Е в позиции 62 - глутаминовая кислота на лизин (E62K). Аминокислотные замены встречались у всех вирусов по всей молекуле HA1: в позициях 50 – глутаминовая кислота на лизин (E50K), 260 (I260M), 223 – изолейцин на валин (I223V), 138 серин на аланин (S138A), 156 глутамин на гистидин (Q156H), 186 валин на глицин (V186G), 122 аспарагиновая кислота аспарагин (D122N), 309 валин на изолейцин (V309I), 316 лейцин на аргинин (L316R), 317 аланин на пролин (A317P). Все штаммы по аминокислотному составу были близки эталонному штамму А/Перт/16/09 и содержали свойственные ему ключевые замены I260M & R261Q, которые сопровождалась заменой P162S. Генетический анализ последовательностей гемагглютинина вирусов, циркулирующих в сезоне 2011-

2012 г. показал большое разнообразие аминокислотных замен, которые коснулись как глобулярную, так и стволовую часть молекулы HA. У большинства вирусов мы регистрировали общие замены в глобулярной части молекулы HA: в сайте A в позиции 145 (N145S), в сайте B в позициях 189 (N189K) и 162 (P162S), в сайте D в позиции 212 - треонин на аланин (T212A), в сайте C в позиции 278 – аспарагин на лизин (N278K), а также в позициях 25 – изолейцин на метионин (I25M), 33 – замена глутамина на аргинин (Q33R), 45 – серин на аспарагин (S45N), 48 – треонин на изолейцин (T48I), 114 – серина на аланин (S114A), связанная с приобретением сайта гликозилирования, 198 – аланин на серин (A198S), 223 – валин на изолейцин (V223I), 260 (I260M), 261 (R261Q), 312 – аспарагин на серин (N312S) и в молекуле HA2 в позициях 378 – аспарагин на лизин (N378K), 487 – аспарагиновая кислота на аспарагин (D487N), 505 – валин на изолейцин (V505I). В связи с таким множеством аминокислотных замен, вирусы гриппа A(H3N2) сезона 2011-2012 начали разделять внутри клайдов на различные генетические группы, которые отличались друг от друга наличием универсальных замен. Так, например, штамм A/Томск/1/2012, который имел в своём составе замену в позиции 144 в антигенном сайте A - аспарагин на аспарагиновую кислоту (N144D), связанную с потерей сайта гликозилирования, относился к генетической группе 3A - A/Стокгольм/18/2011 (N144D, N145S, V223I & D487N). Все остальные штаммы принадлежали 3C генетической группе - A/Гонконг/3969/2011 (S45N, T48I, A198S, V223I & N312S). Две генетические группы (3C и 3A) относились к клайду A/Виктория/208/2009 и несли характерную замену T212A. Как и вирусы, циркулирующие в предыдущем сезоне, изученные нами изоляты сезона 2012-2013 г. также разделялись на генетические группы. Все штаммы, которые отмечались аминокислотными изменениями в HA S45N, T48I, A198S, Q33R, N278K, дополнительной заменой T128A, которая связана с потерей сайта гликозилирования, а также заменами R142G и N145S в антигенном сайте A молекулы HA1, были отнесены к генетической группе 3C, которая была представлена эталонным штаммом A/Виктория/361/11. Большинство вирусов

несли замены в двух антигенных сайтах: в сайте В в позиции 158 (D158N) и в сайте С в позиции 278 (N278K). В последовательностях субмолекулы HA1 были найдены замены в 8 позициях: 312 (N312S), 223 (V223I), 121 – аспарагин на лизин (N121K), 128 – треонин на аланин (T128A), 198 – аланин на серин (A198S), 48 (T48I), 33 (Q33R) и 45(S45N), связанная с приобретением сайта гликозилирования.

Таким образом, изучение аминокислотного состава последовательностей гемагглютининов вирусов гриппа А(Н3N2) показало, что основные изменения затронули субмолекулу HA1, и в частности антигенные сайты, располагающиеся в глобулярной части HA. Наибольшее количество изменений было зарегистрировано в двух антигенных сайтах А и В, что указывает на тот факт, что они в большей мере подвержены действию положительной селекции, нежели сайты С, D и E. Небольшим изменениям подверглись и последовательности молекулы HA2, соответствующие стволу части HA, подтверждая тот факт, что эта часть является наиболее консервативной в структуре гемагглютинина, что обуславливается её опорными функциями. Вместе с тем, несмотря на высокий уровень гомологии российских изолятов, среди них были вирусы, которые несли специфические замены в последовательности HA (T10M, Q57H, V182I).

### **2.3.3. Филогенетический анализ последовательностей гемагглютинина эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.**

Используя полученные полноразмерные сегменты HA вирусов гриппа А(Н3N2), с помощью программы Mega 5.2 построение филогенетических дендрограмм осуществляли на основе алгоритмов “ближайшего соседа” (Neighbor-Joining Tree) и «максимального схожести» (Maximum Likelihood Tree) в рамках 2-параметрической модели М. Кимуры с последующим 1000-кратным ресэмплингом. Полноразмерные последовательности гемагглютинина эталонных штаммов вируса гриппа А(Н3N2), были получены из базы данных

GenBank.

На рис. 3 представлено филогенетическое дерево последовательностей гемагглютинаина штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изученных в период с 2003 по 2013 гг. Так, штаммы циркулировавшие с 2003 по 2004 гг., А/Хабаровск/97/2003, А/Великий Новгород/73/2003 и А/Пермь/116/2003 при филогенетическом сравнении были наиболее близки к эталонному штамму А/Фуцзянь/411/02 и несли общую замену G479E. Остальные штаммы сформировали отдельную группу, для которой были характерны замены Y159F, S189N, S227P в последовательностях HA, и которые были также найдены у репрезентативного штамма А/Веллингтон/1/04 (А/Фуцзянь/411/02 – подобный штамм).

Штаммы А/Ярославль/13/2005, А/Москва/7/2005 и А/Екатеринбург/1/2006 циркулировавшие в период с 2004 по 2006 гг. филогенетически были близки референс-штамму А/Калифорния/7/04 и обладали заменами K145N и V226I. Хотя наличие таких замен как S193F и D225N в последовательностях гемагглютинаина предполагало их близкое родство к вирусам, подобным А/Висконсин/67/05, филогенетический анализ показал, что штаммы А/Владимир/7/2007, А/Ярославль/127/2007, А/Москва/39/2007 и А/Владимир/84/2007 принадлежали клайду, эталоном которого был штамм А/Брисбан/10/07.

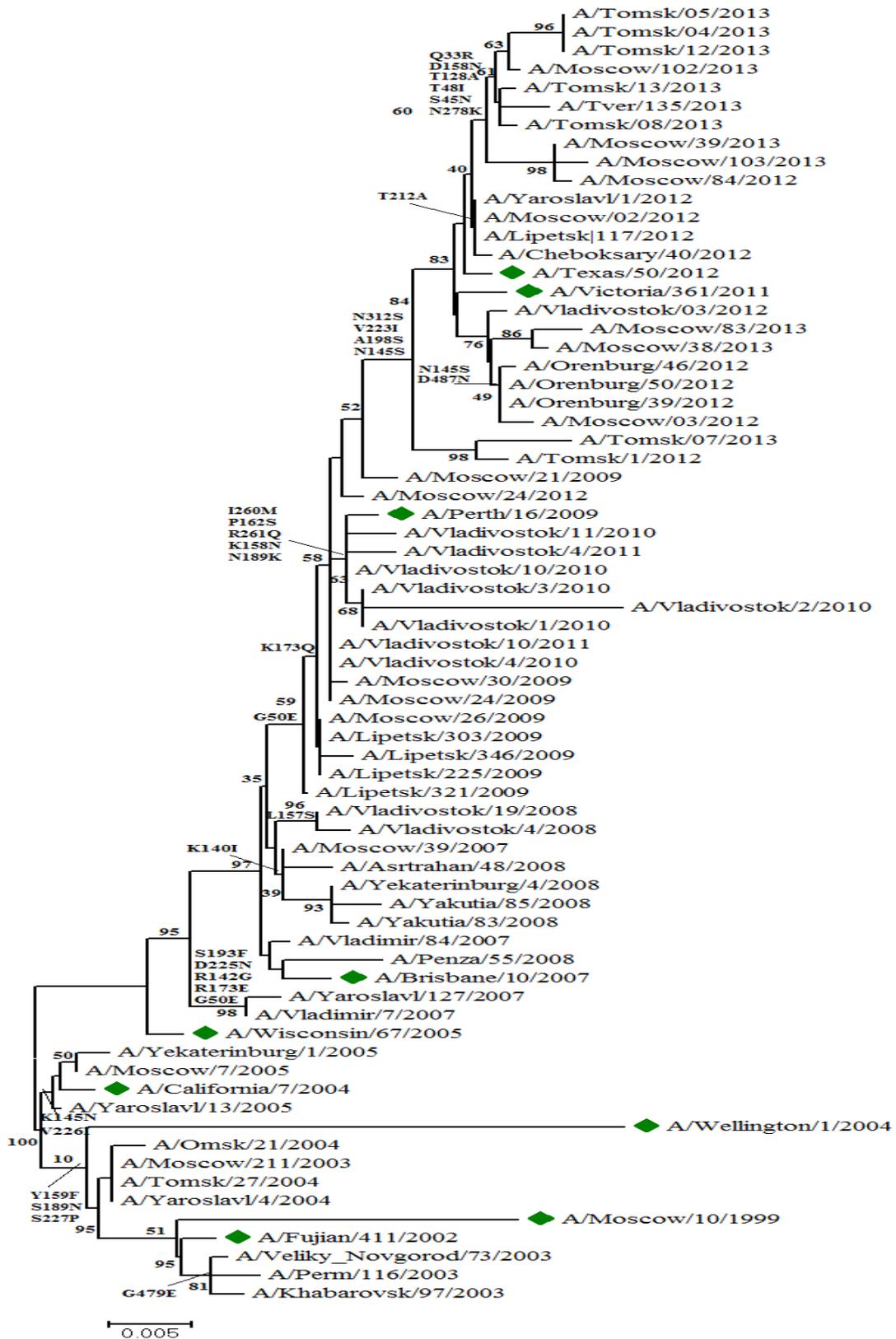
Штаммы следующего сезона (2007-2008 гг.) также входили в клайд А/Брисбан/10/07- подобных вирусов, с характерными для него заменами K140I и G50E.

Филогенетическое сравнение последовательностей HA выявило принадлежность эпидемических штаммов 2008-2009 гг. к клайду А/Брисбан/10/07 с характерной для него генетическим маркером K173Q.

Штаммы, выделенные в г.Владивостоке в сезоне 2010-2011 гг., входили в клайд А/Перт/16/09 - подобных вирусов с ключевыми заменами I260M и R261Q. Вирусы 2011-2012 гг. филогенетически были близки эталону А/Виктория/361/11, а вирусы 2012-2013 гг. близки референс-штамму А/Техас/50/12. Изоляты этих

двух сезонов отмечались общими заменами S45N,T48I, A198S, V223I, N312S. Кроме того, на филогенетической дендрограмме видно, что последовательности HA штаммов вируса гриппа А (H3N2), полученных из г.Томска, эволюционно ушли дальше от последовательности HA эталонного штамма А/Техас/50/12.

Таким образом, филогенетическое сравнение последовательностей генов гемагглютинина исследуемых нами штаммов показало, что они были близки эталонным вариантам, рекомендованных экспертами ВОЗ в качестве вакцинных в соответствующие сезоны.



◆ - эталонные штаммы

Рис. 3. Филогенетическое сравнение последовательностей гемагглютинина вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.

## 2.4 Молекулярно-генетический анализ гена NA эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2)

### 2.4.1 Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена NA эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2)

Шестой сегмент, кодирующий белок нейраминидазу длиной в среднем составляет 1400-1428 н.о. Чтобы получить полную нуклеотидную последовательность гена NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2) для первого раунда ПЦР мы выбрали три пары праймеров (таб.10): первая пара праймеров 5NTRF – 823R была определена на начало сегмента, вторая пара 667F-1296R на середину и третья пара 846F-1423R на конец фрагмента. Таким образом было получено три фрагмента длиной  $\approx 823$  н.о., 629 н.о. и 577 н.о.

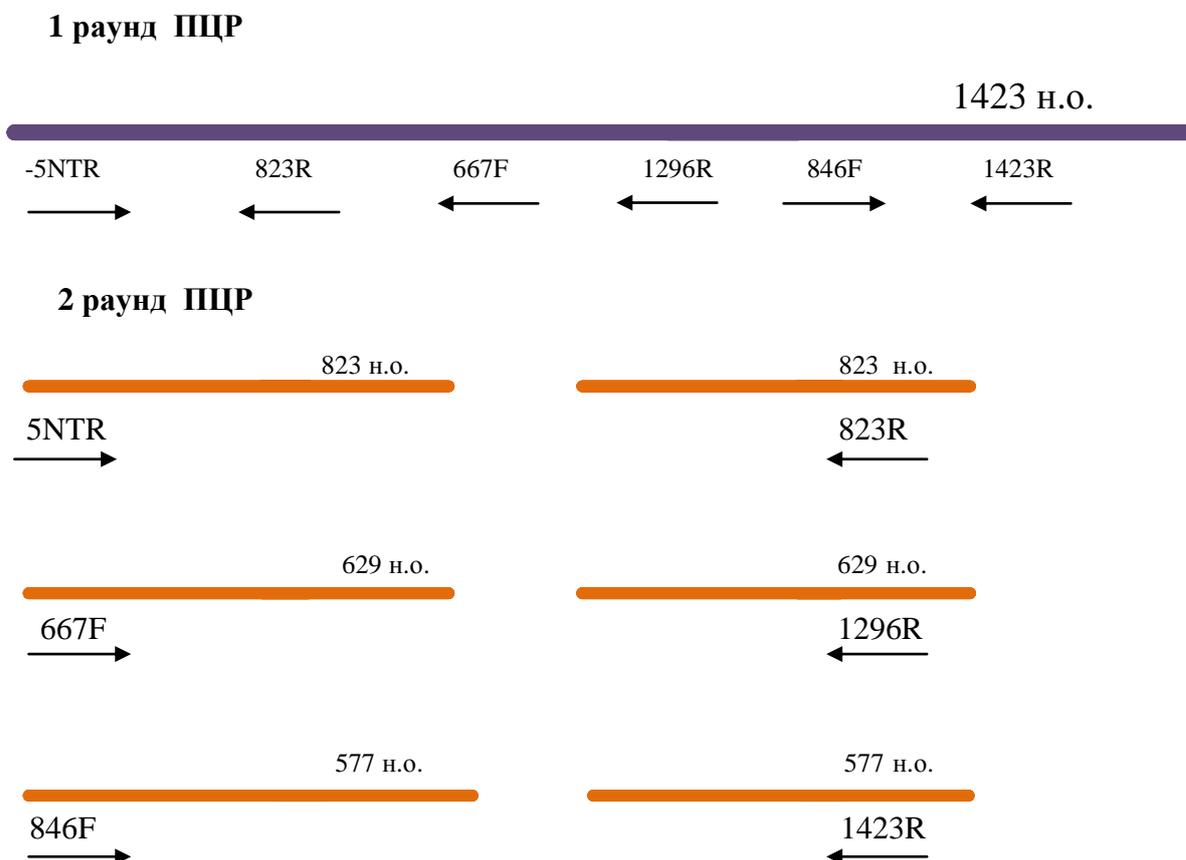
Таблица 10

#### Праймеры для амплификации полноразмерного сегмента нейраминидазы вируса гриппа А(Н3N2)

Название праймера	Последовательность
1296R	5'-TTTTCTTCCCCTAATCAACTCCAC-3'
823R	5'-GCTGAGCACTTCCTG ACAAT-3'
1423R	5'-TTGCGAAAG CTTATATAGGCAT-3'
667F	5'-CCCAGGAGTCAAGAATGCGTTG-3'
5NTR	5'-AGCAAAAGCA GGAGTAAAGATGA-3'
846F	5'-TCCTCGATATC CTGGTGTCAAGATG-3'

Поскольку необходимо было получить нуклеотидные последовательности полноразмерного гена нейраминидазы, реакцию секвенирования проводили с праймеров, которые использовали в первом раунде ПЦР в разведении 3,3 pmol. Так, на начало или на конец каждого полученного фрагмента подбирались прямой или обратный праймеры, соответствующие своему фрагменту (рис.4)

Полученные фрагменты складывали в единую последовательность в программе SeqMan (DNASTAR Inc.,USA), что позволило провести дальнейший молекулярно-генетический анализ гена нейраминидазы.



**Рис. 4. Стратегия подбора праймеров для получения полноразмерного сегмента нейраминидазы.**

#### **2.4.2. Анализ аминокислотной последовательности белка нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа А (H3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.**

Проведённый молекулярно-генетический анализа последовательностей нейраминидазы вирусов гриппа А(H3N2) 2003-2006 гг. показал наличие общих для всех штаммов аминокислотных замен в последовательностях гликопротеида NA в четырех позициях: 93 - аспарагина на аспарагиновую кислоту (N93D), 199

- глутаминовой кислоты на лизин (E199K), 432 – глутамин на глутаминовую кислоту (Q432E). Штаммы А/Москва/7/2005 и А/Екатеринбург/1/2006 несли замену лизина на глутаминовую кислоту (K221E) и лизина на аспарагин (K431N). Нужно отметить, что вирусы несли ключевые замены, характерные для эталонных штаммов А/Фуцзян/411/02 (N93D, E199K и Q432E) и А/Калифорния/7/04 (E221K). Вирусы, циркулировавшие в сезоне 2006-2007, характеризовались заменой в позиции 370 – лейцин на серин (L370S). Данная ключевая замена L370S, была найдена для всех исследуемых нами штаммов и являлась генетическим маркером нейраминидазы эталонного штамма А/Висконсин/67/2005. Штаммы А/Владимир/84/2007 и А/Москва/39/2007 несли изменения в позициях 150 – гистидин на аргинин (H150R), 194 – валин на изолейцин (V194I), 315 – серин на аргинин (S315R), 372 – серин на лейцин (S372L), 378 – аспарагин на лизин (N378K). Штамм А/Москва/39/2007 нес мутацию в позиции 310 – тирозин на гистидин (Y310H), а штамм А/Владимир/7/2007 нес замену в в позиции 43 – аспарагин на серин (N43S). Аминокислотные замены H150R, N43S, S315R были присущи вирусам близкородственным А/Висконсин/67/05. Генетический анализ штаммов 2007-2008 гг. показал, что большинство были схожи по своему аминокислотному строению с нейраминидазой штаммов, циркулирующих в предыдущем сезоне и также отмечались заменой L370S, характерной для эталонного штамма А/Висконсин/67/2005. Изменения были отмечены по всей молекулы NA в восьми позициях: 43 (N43S), 150 (H150R), 194 (V194I), 215- замена валина на изолейцин (V215I), 310 (Y310H), 370 (L370S), 372 (S372L), 387 (N387K). У штамма А/Владивосток/19/2008 замены затронули несколько позиций: 30 – изолейцин на валин (I30V), 32 - треонин на валин (T32V) 35 – лейцин на глутамин (L35Q), 240- валин на лейцин (V240L). У ряда штаммов также отмечались замены в молекуле нейраминидазы: в 45 позиции – пролин на лейцин (P45L), 147 – аспарагин на аспарагиновую кислоту (N147D), 263 позиции – треонин на лизин (T263K), 278 – цитозин на аргинин (C278R), 313 – валин на аланин (V313A), 339 – аспарагиновая кислота на аспарагин (D339N), 416 –

серин на аспарагин (S416N). У двух штаммов А/Якутия/83/2008 и А/Пенза/55/2008, циркулирующих в сезоне 2007-2008 появилась новая значимая аминокислотная замена D151G в активном центре NA, которая была связана с изменениями в специфичности NA таким образом, что молекула нейраминидазы приобрела способность связывать рецепторы, которые ранее были устойчивы к ферментативному расщеплению. В последовательностях нейраминидазы у вирусов гриппа А(Н3N2), циркулирующих в сезоне 2008-2009 мы нашли шесть общих аминокислотных замен: 150 (H150R), 194(V194I), 215 – изолейцин на валин (I215V), 310 (Y310H), 372 (S372L), 387(N387K). Важно отметить, что все вирусы несли замену в сайте гликозилирования в позиции 147 – аспарагиновая кислота на аспарагин (D147N), которая принимает участие в нарушении стабильности белок - белкового комплекса нейраминидаза-плазминоген, что приводило к снижению патогенности вируса гриппа. Кроме того, замены D147N и I215V являются генетическими ключевыми заменами, характерными для вирусов подобных эталонному штамму А/Брисбан/10/2007. Большинство вирусов также несли замены в позициях 145 - аспарагиновая кислота на серин (D145S), 336 – гистидин на аспарагин (H336N), 464 – изолейцин на лизин (I464L). У них встречались аминокислотные замены в позициях 19 – треонин на аланин (T19A), 30 (I30V), 32 (T32I), 56 – треонин на лизин (T56K), 221 – глутаминовая кислота на аспарагиновую кислоту (E221D), 225 – треонин на серин (T225S) 259 – глутаминовая кислота на аспарагиновую кислоту (E259D) и 386 – пролин на гистидин (P386H). Большинство аминокислотных замен в молекуле NA вирусов гриппа А(Н3N2), циркулирующие в сезоне 2010 – 2011, были на поверхности тетраметра NA, но далеко от сайта связывания сиаловой кислоты, расположенного между аминокислотными остатками 119 и 274. Так, в отличии от предыдущего сезона, в молекулах нейраминидазы появились новые мутации в позициях: 127 - аспарагиновая кислота на аспарагин (D127N), 147 (D147N), 190 – валин на лейцин (V190L), 285 – лейцин на пролин (L285P), 307 – изолейцин на метионин (I307M), 338 - лейцин на фенилаланин (L338F), 342 – аспарагин на

аспарагиновую кислоту (N342D), 370 – лейцин на серин (L370S), а также были найдены замены, которые встречались ранее N93D, D147N, H150R, Y310H, N387K и I464L. Несколько штаммов несли замены в позициях 402 – аспарагин на аспарагиновую кислоту (N402D), которая была связана с потерей сайта гликозилирования и в 430 – аргинин на серин (R430S). По молекулярно-генетическому строению вирусы были близки эталонному штамму А/Перт/16/2009, однако наличие у нескольких из них генетического маркера N402D (связанна с потерей потенциального сайта гликозилирования), характерного для эталонного штамма А/Виктория/361/11 указывало на факт постоянного непрекращающегося антигенного дрейфа в молекуле НА вирусов гриппа А(Н3N2).

Разделение генов НА штаммов, полученных нами в сезоне 2011-2012, на генетические группы внутри клайдов в связи с большим количеством встречающихся аминокислотных замен, произошло по тем же критериям, что и у генов НА. Штаммы, несли общие для всех замены в положениях 81 – лейцин на пролин (L81P), 93 (D93G) и 464 (I464L). По составу аминокислотных замен вирусы принадлежали 3С генетической группе - А/Гонконг/3969/2011 (D93G, L81P).

Важно отметить, что все штаммы несли две общие новые замены в позициях 367 – серин на аспарагин (S367N) и 369 – лизин на треонин (K369T), которые встречались вместе и были связаны с приобретением потенциального сайта гликозилирования. У ряда вирусов (А/Москва/07/2012, А/Москва/08/2012, А/Москва/10/2012) была выявлена замена N402D(связанна с потерей сайта гликозилирования), которая, как правило, сопровождается заменой L81P. Две эти замены N402D и L81P являлись ключевыми заменами для вирусов подобных А/Виктория/361/11.

Другие штаммы (А/Москва/14/2012, А/Москва/23/2012, А/Чебоксары/18/2012) отмечались заменами в позициях 302 – изолейцин на валин (I302V), 339 аспарагиновая кислота на аспарагин (D339N), 336 – гистидин на аспарагин (H336N). Некоторые штаммы несли изменения в позициях 221 -

глутаминовая кислота на аспарагиновую кислоту (E221D), 346 – глицин на аспарагиновую кислоту (G346D), 400 – аргинин на лизин (R400K), 416 – серин на аспарагин (S416N), 428 – аргинин на аспарагиновую кислоту (R428G), 434 – треонин на аспарагин (T434N).

Молекулярно-генетический состав всех вирусов, циркулирующих в сезоне 2012-2013 очень похож с таковым у вирусов, представляющих предыдущий сезон. В последовательностях NA всех штаммов были отмечены замены в позициях 81 (L81P), 464 (I 464L), 402 (N402D) и две мутации, которые встречаются вместе S367N и K369T, связанные с приобретением потенциального сайта гликозилирования. Все перечисленные аминокислотные изменения позволили отнести исследуемые вирусы к 3С генетической группе, представленной эталонным штаммом А/Виктория/361/11 и референс-штаммом А/Техас/50/2012. Штаммы А/Москва/39/2013, А/Москва/103/13 и А/Москва/84/2012 отмечались заменами в позиции 221 (E221D).

Таким образом, за десять лет последовательность нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2) претерпела значительные изменения. Все штаммы несли генетические маркёры, свойственные соответствующим эталонам, кроме того были найдены значимые замены D151G и D147N, влияющие на изменения свойств вирусов. Как и в последовательностях NA были отмечены замены в NA, связанные с приобретением и потерей потенциальных сайтов гликозилирования (N402D, S367N и K369T). Анализ последовательностей нейраминидазы у исследованных штаммов на наличие мутаций E119V, R292K, N294S, ответственных за резистентность к ингибиторам, не выявил.

Данные о генетических маркёрах чувствительности к противовирусным препаратам в последовательностях нейраминидазы 27 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) 2011-2012 гг. и 8 штаммов 2012-2013 гг. были представлены на сайт Европейского Регионального Бюро ВОЗ (<http://www.euro.who.int>).

### 2.4.3. Филогенетический анализ последовательностей нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.

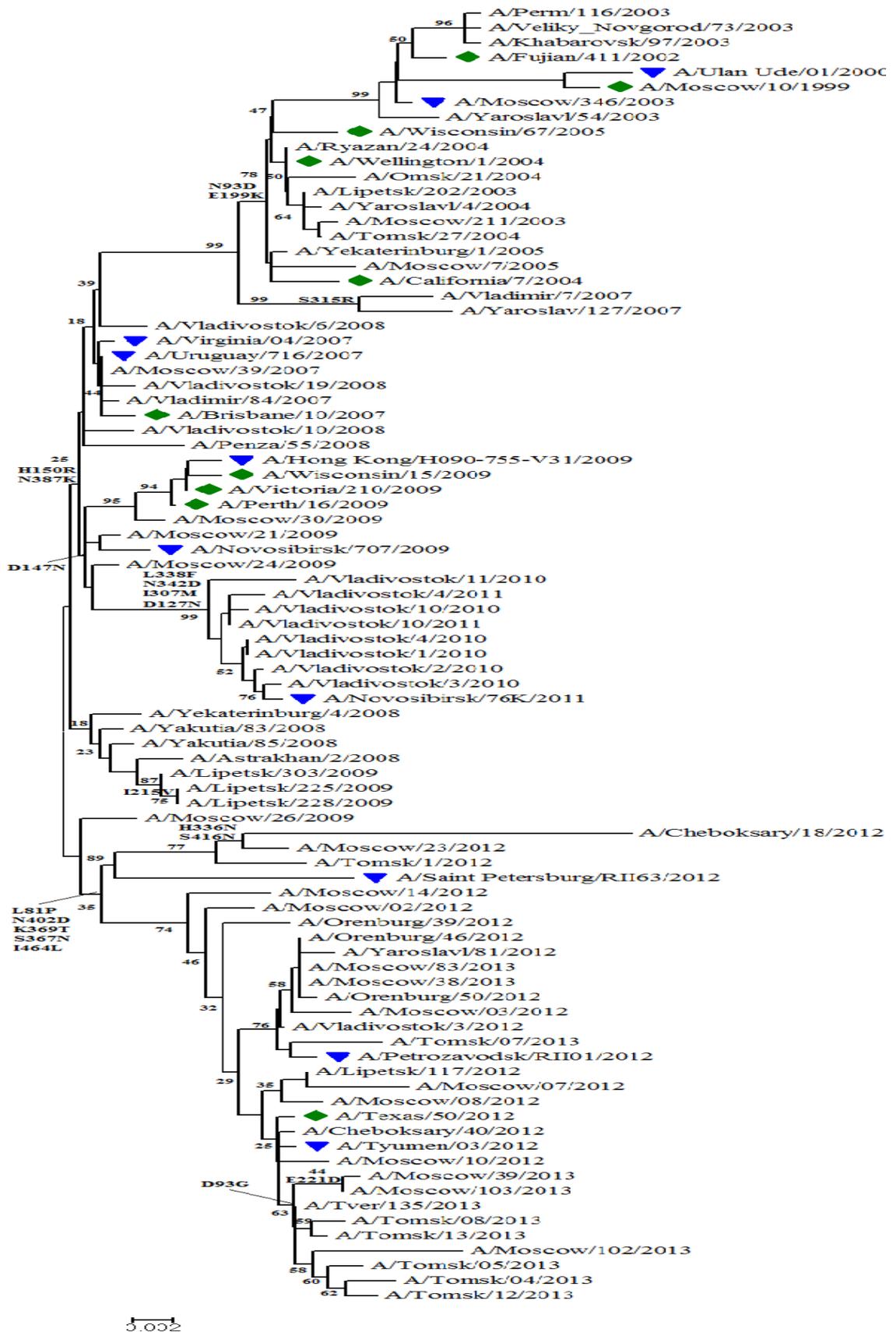
Штаммы циркулирующих в период с 2003 по 2004 года А/Хабаровск/97/2003, А/Великий Новгород/73/2003 и А/Пермь/116/2003 при филогенетическом сравнении были наиболее близки эталонному штамму А/Фуцзян/411/02, сформировав отдельную группу на филогенетическом древе (рис.5). Последовательности нейраминидазы остальных штаммов филогенетически были близки последовательности NA референс - штамма А/Велинктон/1/04 (А/Фуцзян/411/2002 - подобный штамм) с характерными для него заменами N93D и E199K .

На филогенетической дендрограмме штаммы А/Ярославль/13/2005, А/Екатеринбург/1/2005 и А/Москва/7/2005, циркулирующие в период с 2004 по 2006 гг. образовали отдельную группу, которая представлена референс-штаммом А/Калифорния/7/04. Штаммы 2006 - 2007 гг. А/Владимир/7/2007, А/Ярославль/127/2007, А/Москва/39/2007 и А/Владимир/84/2007 принадлежали клайду, эталоном которого выступает штамм А/Брисбан/10/07. Вирусы гриппа А(Н3N2) сезона 2007-2008 входили в клайд А/Брисбан/10/07- подобных вирусов и отмечались заменами N387K и H150R. Последовательности нейраминидазы других штаммов А/Астрахань/2/2008, А/Якутия/83/2008, А/Якутия/85/2008 и А/Екатеринбург/4/2008 образовали отдельную группу вирусов, которая несла замену D339N. Филогенетический анализ штаммов А/Москва/21/2009, А/Москва/24/2009 и А/Москва/30/2009 показал, что они были близки эталонному штамму А/Перт/16/09. Вирусы гриппа А(Н3N2), полученные из Владивостока в эпидемическом сезоне 2010-2011 гг. принадлежали клайду А/Перт/16/2009- подобных вирусов и филогенетически были близки российскому штамму А/Новосибирск/76К/2011, выбранного нами в качестве референс - штамма.

Вирусы 2011-2012 гг. филогенетически были близки российским штаммам А/Санкт-Петербург/R1163/2012 и А/Петрозаводск/R1101/2012

(А/Виктория/361/11 - подобные вирусы) и несли две общие замены L81P и N402D, а последовательности NA вирусов гриппа А(Н3N2) 2012-2013 гг. были близки последовательности NA референс - штамма А/Техас/50/2012 с заменой D93G.

Таким образом, филогенетическое сравнение последовательностей генов нейраминидазы показало, что они были близки эталонным штаммам и другим российским изолятам вируса гриппа А(Н3N2).



◆ - эталонный вакцинный штамм    ▼ - референс-штамм

Рис. 5. Филогенетическое сравнение последовательностей нейраминидазы вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.

## 2.5. Молекулярно-генетический анализ гена белка М эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2)

### 2.5.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена белка М эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2)

Седьмой сегмент генома вируса гриппа А(Н3N2), кодирующий два белка, матриксный (М1) и трансмембранный (М2), составляет в длину примерно 1029 н.о. Для изучения молекулярно-генетического строения гена белка М, нам необходимо было получить его полноразмерный сегмент. Для этого мы использовали две пары праймеров, которые несли нуклеотидные последовательности комплементарные универсальным праймерам М13F и М13R (таб. 10): первая пара праймеров -4F-753R была определена на первую половину сегмента, а вторая пара 541F-1024R на вторую половину.

**Таблица 11**

#### Праймеры первого раунда ПЦР

для амплификации фрагментов М белка вируса гриппа А(Н3N2)

Название праймера	Последовательность
1024R	5'-caggaaacagctatgaccAGAAACAAGGTAGTTTTTTACTCCA-3'
541F	5'-tgtaaaacgacggccagtAATCAGRCATGAGAACAGRATGGT-3'

Полученные фрагменты длиной  $\approx 823$  н.о. и 629 н.о. мы использовали во втором раунде ПЦР, где амплифицировали их с двух универсальных праймеров – прямого (forward) М13F либо обратного (reverse) М13R, как показано на рисунке 6.



период с 2009 по 2013 гг. Мутация I219V находилась в последовательностях белка М1 у штаммов А/Рязань24/2004, А/Томск/27/2004, А/Ярославль/4/2004, А/Екатеринбург/1/2005, А/Москва/211/2003 и А/Омск/21/2004.

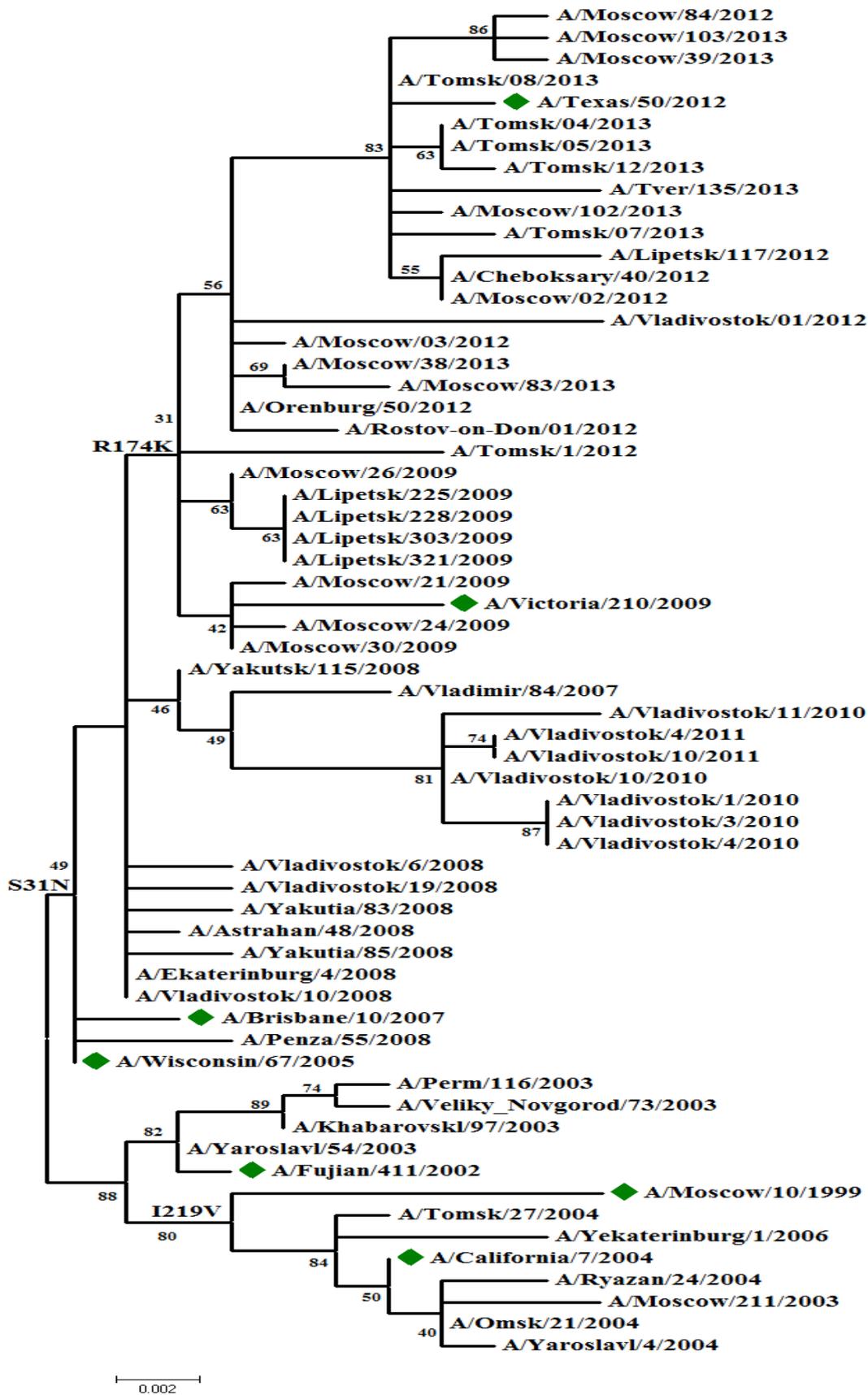
Другие аминокислотные замены, встречающиеся в последовательностях белка М носят единичный характер. Так, замены аргинина на лизин R230K, тирозин на аланин T249A, валин на серин V142S, валин на изолейцин V147I, аланин на треонин A167T, изолейцин на валин I205V были найдены в молекуле белка М1 у штаммов А/Астрахань/2/2008. А/Астрахань/48/2008 нес изменения в позиции 160 – аргинин на лизин (R160K), А/Москва/103/2013 T249A, А/Москва/211/2003 в позиции 227- тирозин на аспарагиновую кислоту (T227A), А/Москва/83/2013 в позиции 174 – глутамин на глутаминовую кислоту (Q174E), А/Екатеринбург/1/2005 в позиции 211 – глутамин на аргинин (Q211R), А/Владивосток/11/2011 в позиции 40 – изолейцин на метионин (I40M), А/Якутия/85/2008 в позициях 32 – фенилаланин на лейцин (F32L) и 33 – аланин на пролин (A33P), 33- аланин на аспарагиновую кислоту (A33D), 142 – валин на лизин (V142L) и штамм А/Ярославль/4/2004 нес замену в позиции 64 – фенилаланин на лейцин (F64L).

Таким образом, анализ аминокислотных последовательностей генов белка М показал, что изменения встречались как в белке М1, так и в белке М2. Было показано, что штаммы вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших после 2005г. содержали основной маркер устойчивости к адамантанам S31N, но других мутаций отвечающих за устойчивость к лекарственным препаратам в положениях 26, 27, 30, 31, 34, выявлено не было.

### **2.5.3. Филогенетический анализ последовательностей белка М эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.**

Филогенетическая дендрограмма последовательностей белка М (рис.7) демонстрирует последовательное разделение штаммов вируса гриппа А(Н3N2) по группам в зависимости от периода циркуляции и эталонного штамма. Штаммы А/Пермь/116/2003, А/Великий Новгород/73/2003, А/Хабаровск/97/2003

и А/Ярославль/54/2003 были близки по структуре к эталонному штамму А/Фузьян/411/2002. Другая группа штаммов 2004-2005 гг. по генетическим характеристикам была близка вакцинному штамму А/Калифорния/7/2004 и несла замену I219V. Все последовательности генов белка М вирусов гриппа А(Н3N2) близкие по структуре последовательностям эталонных штаммов А/Висконсин/67/2005 и А/Брисбан/10/2007 несли замену S31N, отвечающую за устойчивость к адамантанам. Штаммы, циркулирующие в период с 2009 по 2013гг., образовали отдельную группу, которая несла замену R174K. Внутри этой группы штаммы, выделенные в сезоне 2008-2009гг., филогенетически были близки референс-штамму А/Висконсин/15/2009, а группа вирусов 2012-2013 гг. была представлена эталонным штаммом А/Техас/50/2012.



◆ - эталонный штамм

Рис. 7. Филогенетическое сравнение последовательностей белка М вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших в период 2003-2013гг.

### **ГЛАВА 3. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших на территории России с 2003 по 2013 гг.**

#### **3.1. Активность вируса гриппа В, как этиологического агента эпидемических подъемов заболеваемости в период 2009-2013гг. и его антигенные свойства**

В отличие от штаммов вирусов гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) появление в 2009г. в активной циркуляции пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 значительно не повлияло на его эпидемическую активность в последующие годы (табл.12).

**Таблица 12**

**Частота детекции положительных случаев гриппа В в клиническом материале (суммарные данные лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа и опорных баз ЦЭЭГ) в период 2009-2013гг.**

Методы детекции вируса гриппа В	Детекция положительных случаев гриппа В в клиническом материале (абс. (%) / число образцов)			
	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013
ОТ-ПЦР-РВ	240 (1,5) / 15 624	493 (4,6) / 10 730	273 (3,7) / 7315	498 (4,5) / 11 142
Изоляция штаммов	116 (3,9) / 3039	133 (4,8) / 2760	137 (6,8) / 2008	159 (8,0) / 1986
Долевое участие в структуре вирусов гриппа (абс. (%) / число случаев гриппа)	240 (5,5) / 4 394	493 (17,0) / 2913	273 (27,0) / 1023	498 (22,0) / 2313

В 2009-2010гг. штаммы вируса гриппа В вызвали вторую волну подъема заболеваемости в феврале-апреле 2010г., определив моноэтиологичность эпидемии. В целом за сезон их долевое участие составило 5,5%. Их активность была отмечена на всех территориях РФ, сотрудничающих с ЦЭЭГ. Штаммы были выделены в ЦЭЭГ, Москва, гг. Томске и Владивостоке. Детальное типирование 70 штаммов вируса гриппа В определило их родство к В/Брисбен/60/2008 (вакцинный), и, в тоже время, выявило их гетерогенность: штаммы взаимодействовали с сывороткой к этому эталону в пределах от 1 до 1/4 гомологичного титра. Один штамм, выделенный во Владивостоке, был определен как В/Ямагата-подобный и взаимодействовал с сывороткой к В/Флорида/04/06 до 1/64 гомологичного титра.

В 2010-2011гг. штаммы вируса гриппа В социркулировали с А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), причем их активность была выше по сравнению с участием вируса гриппа А(Н3N2). По данным ПЦР частота положительных проб составила: на вирус гриппа В 4,6%, А(Н1N1)pdm09 – 21,9% и А(Н3N2) – 0,9%. Долевое участие в структуре вирусов гриппа в среднем за сезон составило 17,0%. Активность вируса гриппа регистрировали на всех территориях РФ, сотрудничающих с ЦЭЭГ, при этом, штаммы были выделены в гг. Москве, Томске, Владивостоке и Биробиджане. Результаты типирования 118 штаммов вирусов гриппа В показали, что 109 из них (92,4%) были подобны вакцинному вирусу - В/Брисбен/60/07 (линия В/Виктория-подобных), а 9 штаммов – эталону другой эволюционной ветви - В/Флорида/04/06 (В/Ямагата-подобных).

В 2011-2012гг. вирус гриппа В социркулировал с вирусами гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), при этом его активность была несколько выше по сравнению с вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09. По данным ПЦР частота положительных проб составила: на вирус гриппа В 3,7%, А(Н1N1)pdm09 – 0,2% и А(Н3N2) – 10,0%. Долевое участие в структуре вирусов гриппа в среднем за сезон составило 27,0%. Активность вируса гриппа регистрировали на всех территориях РФ, сотрудничающих с ЦЭЭГ. 111 штаммов вируса гриппа В, изученных в ЦЭЭГ, были выделены из носоглоточных смывов, поступивших из

гг. Москвы, Томска, а также рекультивированы из изолятов, выделенных в г. Владивостоке в январе – мае 2012г. Детальное типирование штаммов определило их родство с эталоном В/Брисбен/60/2008 (линия В/Виктория-подобных) – 99 штаммов (89%) и 12 штаммов (11,0%) – с В/Висконсин/1/2010 (линия В/Ямагата-подобных).

В 2012-2013гг. штаммы вируса гриппа В социркулировали с А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), при этом, по данным ПЦР диагностики, их доленое участие составило - 4,5%, 9,3% и 7,0% соответственно. Доленое участие в структуре вирусов гриппа в среднем за сезон составило 22,0%. Их активность регистрировали на всех территориях опорных баз ЦЭЭГ. Штаммы были выделены в гг. Москве (ЦЭЭГ), В.Новгороде, Владимире, Томске и Владивостоке. Популяция вируса гриппа В была представлена штаммами обеих эволюционных линий, при этом штаммы, подобные В/Висконсин/01/09 (линия В/Ямагата-подобных) в подавляющем большинстве отличались от референс-штамма на 1/8 и более гомологичного титра (74 штамма или 68,0%). В тоже время, в популяции штаммов, подобных В/Брисбен/60/08 (линия В/Виктория-подобных) такие варианты встречались значительно реже (3 штамма или 9,0%).

Таким образом, появление в активной циркуляции пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 не оказало значительного влияния на активность вируса гриппа В в качестве эпидемического агента. В период 4 анализируемых сезонов вирус гриппа В социркулировал с вирусами А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), причем его активность регистрировали на всех территориях РФ, сотрудничающих с ЦЭЭГ не зависимо от сезона. По антигенным свойствам популяция циркулировавших штаммов была гетерогенна и представлена вариантами обеих эволюционных линий вируса гриппа В - линией В/Ямагата-подобных и линией В/Виктория-подобных. При этом по антигенным свойствам циркулировавшие штаммы в подавляющем своем большинстве были близкородственны вирусам, входившим в состав гриппозных вакцин в соответствующий сезон.

### **3.2. Характеристика штаммов вируса гриппа В выделенных на отдельных территориях РФ в 2003-2013гг. и отобранных для проведения молекулярно-**

**генетического анализа.**

Для изучения эволюционной изменчивости вирусов гриппа В, одной из задач настоящего исследования стал подбор репрезентативной выборки штаммов вирусов гриппа В, циркулировавших на территории Российской Федерации в период 2003-2013гг. Критериями отбора штаммов послужили эпидемический сезон, географическое распространение, степень ингибирования специфической сывороткой эталонного вируса (отношение к гомологичному титру). В исследование были включены 52 штамма, выделенных в период 10 последних эпидемических сезонов (табл.13).

**Таблица 13**

**Характеристика штаммов вируса гриппа В, отобранных для проведения молекулярно-генетических исследований**

Эпидемический сезон	Штаммы вируса гриппа В	Отношение титра ингибирования сывороткой эталона к гомологичному титру	Эталонный штамм
2003-2004	В/Хабаровск/19/2003	1:4	<b>В/Гонконг/330/01 (Викторианская линия)</b>
	В/Москва/9/2003	1:2	
	В/НижнийНовгород/21/2003	1:8	
	В/Ярославль/14/2003	1:4	
2004-2005	В/Хабаровск/57/2005	1:2	<b>В/Шанхай/361/02 (Ямагатская линия)</b>
	В/Ярославль/13/2005	1:8	
	В/Москва/1/2005	1:1	
	В/Москва/3/2004	1:1	
	В/Ровно/7/2005	1:2	
	В/Рязань/7/2005	1:1	
2005-2006	В/Якутск/32/2006	1:4	<b>В/Малайзия/2506/04 (Викторианская линия)</b>
2006-2007	В/Астрахань/1/2007	1:2	
	В/Краснодар/2/2007	1:2	
	В/Липецк/20/2007	1:2	
	В/Нижний Новгород/24/2007	1:8	
2007-2008	В/Владивосток/40/2008	1:16	<b>В/Флорида/04/06 (Ямагатская линия)</b>
	В/Астрахань/55/2008	1:32	
	В/НижнийНовгород/82/2008	1:32	
	В/Самара/56/2008	1:32	

	В/Томск/58/2008	1:16	
	В/Томск/63/2008	1:8	
	В/Астрахань/3/2008	1:16	
	В/Оренбург/1/2008	1:16	
2008-2009	В/Москва/5/2009	1:1	<b>В/Малайзия/2506/04 (Викторианская линия)</b>
	В/Москва/6/2009	1:2	
2009-2010	В/Москва/28/2010	1:8	<b>В/Брисбан/60/08 (Викторианская линия)</b>
	В/Москва/38/2010	1:4	
	В/Москва/18/2010	1:4	
	В/Москва/08/2010	1:2	
	В/Москва/10/2010	1:4	
2010-2011	В/Оренбург/5/2011	1:4	
	В/Москва/18/2011	1:1	
	В/Москва/4/2011	1:2	
	В/Москва/48/2011	1:1	
	В/Оренбург/7/2011	1:4	
2011-2012	В/Биробиджан/24/2012	1:8	
	В/Биробиджан/44/2012	1:8	
	В/Владивосток/3/2012	1:2	
2012-2013	В/Москва/44/2013	1:4	
	В/Москва/76/2013	1:8	
	В/Москва/78/2013	1:8	
	В/Москва/91/2013	1:8	
	В/Москва/2/2013	1:16	
	В/Томск/02/2013	1:16	
	В/Москва/49/2013	1:8	
	В/Томск/03/2013	1:4	
	В/Москва/45/2013	1:8	
	В/Томск/04/2013	1:16	
	В/Томск/05/2013	1:16	
	В/ВеликийНовгород/28/2013	1:32	
	В/Ярославль/1/2013	1:4	
	В/Москва/93/2012	1:2	
	В/Москва/3/2013	1:16	
	В/Томск/27/2013	1:8	
	В/Томск/31/2013	1:8	
	В/Томск/32/2013	1:8	

Исследуемые нами штаммы вируса гриппа В, которые мы подобрали по

антигенным свойствам и по принадлежности к эталонным штаммам за 10 эпидемических сезонов, отражали изменчивость двух эволюционных линий вируса гриппа В по антигенным свойствам и принадлежали к трём эталонным вариантам В/Ямагатской линии: В/Шанхай/361/2002, В/Флорида/04/2006, В/Висконсин/1/2010, и трём эталонным В/Викторианской линии: В/Гонконг/330/2001, В/Малайзия/2506/2004, В/Брисбан/60/2008.

### **3.3. Молекулярно-генетический анализ гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа В.**

#### **3.3.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена НА эпидемических штаммов вируса гриппа В.**

Анализ первичной структуры гена НА вирусов гриппа В линии В/Ямагата-подобных и линии В/Виктория-подобных выявил различия в их строение, что характеризовалось большим количеством вариабельных участков в их последовательностях, отличающих одну линию от другой. Таким образом, для того, чтобы получить полноразмерный сегмент НА нам необходимо было подобрать три пары праймеров — пара (-10)F - 722R на начало фрагмента, пара 553F - 11352R на середину и пара 1114F - 1722R на конец фрагмента - для штаммов В/Ямагатской линии (таб. 19) и три пары праймеров- 19F - 714R на начало фрагмента, 662F - 1230R на середину, 1147F - 1790R на конец - для штаммов В/Викторианской линии (таб. 18).

Места посадки праймеров были также выбраны на наиболее консервативные участки, путём сравнения в программе MegaLine (Lasergene, США) последовательностей НА 45 штаммов вирусов гриппа В Ямагатской линии и 30 штаммов Викторианской линии, циркулирующих в разные года в разных странах, полученных из GenBank. Прямые праймеры несли универсальные нуклеотидные последовательности, которые были комплементарны праймеру M13F, а обратные праймеры несли последовательности, комплементарные праймеру M13R (рис. 11).

Реакцию сиквенирования проводили с универсальных праймеров – прямого (forward) M13F и обратного (reverse) M13R. Три полученных отдельных фрагмента складывали в единую последовательность и проводили молекулярно-генетический анализ.

Таблица 18

**Праймеры первого раунда ПЦР  
для амплификации фрагментов гемагглютинаина вируса гриппа В, подобных  
В/Викторианской линии**

<b>Название праймера</b>	<b>Последовательность</b>
1147F	tgtaaacgacggccagtAGAAGGAGGATGGGAAGGAAT
19F	tgtaaacgacggccagtСТААТАТССАСААААТГААГГСА
662F	tgtaaacgacggccagtТСТГАСАСАГСААААТ
1790R	caggaaacagctatgaccАТАСААААТГААГГСАААААА
714R	caggaaacagctatgaccСТТСТГГГГСТТТГАГТСС
800R	caggaaacagctatgaccТТТТТГТГТГАТССССССТТ
1230R	caggaaacagctatgaccГТСТГСТГССАССГСТАТ

Таблица 19

**Праймеры первого раунда ПЦР  
для амплификации фрагментов гемагглютинаина вируса гриппа В, подобных  
В/Ямагатской линии**

<b>Название праймера</b>	<b>Последовательность</b>
(-10)F	tgtaaacgacggccagtАТССАСААААТГААГГСААТАА
553F	tgtaaacgacggccagtААСААААТГААГГСААТАА
1114F	tgtaaacgacggccagtТТАГААААТГААГГСААТАА
1722R	caggaaacagctatgaccАГСАТГААААТГААГГСААТАА
1352R	caggaaacagctatgaccТСАТССАСТТТТТСАТССАГС
722R	caggaaacagctatgaccААГССГССААТСТГАААААТАА

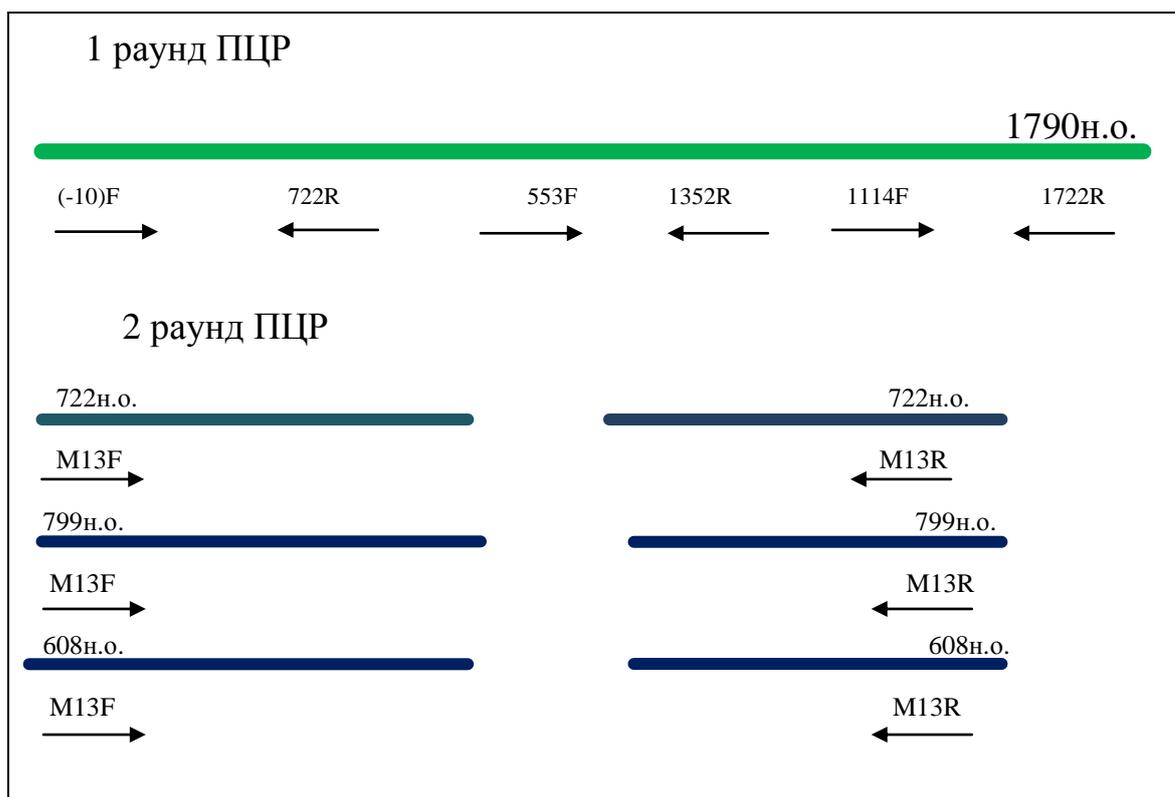


Рис.8. Подбор праймеров для амплификации гемагглютинина вируса гриппа В.

### 3.3.2. Анализ аминокислотной последовательности гемагглютинина эпидемических штаммов вируса гриппа В, циркулировавших в 2003-2013гг.

В последовательностях НА штаммов эпидемического сезона 2003-2004, который принадлежали к В/Викторианской линии, близкородственным эталонному штамму В/Гонконг/330/2001, была выявлена одна общая для всех замена в петле 120 в позиции 121 – изолейцин на треонин (I121T).

Молекулярно-генетический анализ последовательностей НА штаммов 2004-2005 гг. показал, что В/Рязань/7/2005, В/Москва/1/2005 и В/Москва/3/2004 относились к В/Ямагатской линии и по строению были близкородственны эталонному штамму В/Шанхай/361/2002, при этом различаясь общими с ним заменами в трёх позициях: 129 – лизин на аспарагин (K129N) в петле 120, связанной со сменой заряда аминокислоты с положительного на нейтральный, 232 – аспарагиновая кислота на аланин (D232A) и 256 – глицин на аргинин (G256R). Также все штаммы несли замену в позиции 40 - гистидин на тирозин

(H40Y). Штамм В/Хабаровск/57/2005 относился к В/Викторианской линии и нес замены I180V.

Из двух включенных в исследование штаммов 2005 - 2006гг., В/Ровно/7/2005 относился к вирусам подобным референс-штамму В/Шанхай/361/2002 (В/Ямагатская линия) и нес замены в петле 120 в позиции 129 (K129N) и в положении 256 (G256R). Второй штамм, В/Якутск/32/2006, относился к Викторианской линии, к вирусам подобным референс-штамму В/Малайзия/2506/2004 и имел общие с ним изменения в трёх позициях: 48 – аргинин на глутаминовую кислоту (R48E), 80 – лизин на аргинин (K80R), 129 (K129N) в петле 120.

По аминокислотному строению исследуемые штаммы вируса гриппа В 2006-2007 гг. были сходны с эталонным штаммом В/Малайзия/2506/2004 (линия Виктория). Они несли замены в пяти позициях: 40 - тирозин на гистидин (Y40H), 80 (K80R), 129 (K129N) в петле 120 и 487 – аспарагиновая кислота на глутаминовую кислоту (D487E).

По молекулярно-генетическому строению последовательности НА исследуемых нами штаммы 2007-2008 гг. значительно отличались от штаммов, подобных В/Шанхай/361/2002 – они несли характерную замену V252M и являлись дрейф - вариантами вирусов подобных эталонному штамму В/Флорида/04/2006. Часть штаммов несли замены в антигеннозначимых областях молекулы НА: в 150 петле в позиции 150 – замена серина на изолейцин (S150I), в петле 160 в позиции 165 - аспарагин на тирозин (N165Y). Изменения также затронули позиции: 48 – аргинин на лизин (R48K), 108- пролин на аланин (P108A), 229- глицин на аспарагиновую кислоту (G229D).

Два штамма, циркулирующих в сезоне 2008-2009 В/Москва/5/2009 и В/Москва/6/2009 относились к вирусам подобным эталонному штамму В/Малайзия/2506/2004 В/Викторианской линии и отмечались общими заменами, характерными для эталона K48E, K80R, K129N в петле 120. Кроме того, штамм В/Москва/5/2009 нес замену в позиции 75- аспарагин на лизин (N75K).

Последовательности НА вирусов гриппа В 2009-2010 гг. принадлежали к В/Викторианской линии. В ходе антигенного дрейфа штаммы приобрели три значимые замены в позициях 75 (N75K), 165 – замена аспарагина на лизин (N165K) в петле 160 и 146 – замена валина на изолейцин (V146I) в петле 150, характерные для эталонного штамма В/Брисбен/60/2008. Кроме этого, все изучаемые вирусы несли замены K48E, K80R, K129N в петле 120.

Сезон 2010-2011 также характеризовался доминирующей циркуляцией штаммов В/Викторианской линии. Генетический анализ последовательностей НА подтвердил, что все изученные штаммы относились к В/Викторианской линии и были близкородственны вакцинному штамму В/Брисбен/60/2008. Все представители Викторианской линии несли замены в следующих позициях: 48 (K48E), 80 (K80R), 58- лейцин на пролин (L58P), 75 (N75K), 172- серин на пролин (S172P). Изменения также затронули 3 важных антигенных области молекулы НА: петлю 120 в позициях 121 - изолейцин на треонин (I121T), 129 (K129N), петлю 160 в позиции 165 (N165Y) и спираль 190 в позициях 200 – лизин на глутамин (K200Q) и 202 (A202E). Помимо перечисленных аминокислотных замен, штамм В/Москва/4/2011 нёс мутацию, затрагивающую 150 петлю в позиции 146 – валин на изолейцин (V146I).

В эпидемическом сезоне 2011-2012 наблюдалась совместная циркуляция двух эволюционных линий вируса гриппа В. Три из четырех изученных штаммов принадлежали к В/Викторианской линии и по молекулярно-генетическому строению были близки вакцинному штамму В/Брисбен/60/2008, а один штамм принадлежал В/Ямагатской линии и был подобен эталону В/Висконсин/1/2010. Как и в предыдущем сезоне у вирусов В/Викторианской линии изменения затронули позиции 202 в спирале 190 (A202E), 75 (N75K), 172 (S172P), 48 (K48R или K48E), 58 (L58P), а также в позициях 122 – гистидин на аспарагин (H122N) и 136 – лизин на аргинин (K136N) в петле 120. Штамм В/Владивосток/3/2012 нёс дополнительные замены в позициях 171 – аспарагин на аспарагиновую кислоту (N171D), 129 – аспарагин на аспарагиновую кислоту (N129D) в петле 120. В/Москва/93/2012 (В/Ямагатская линия) содержал замены в двух антигенных

областях: в петле 150 – S150I и в петле 160 - N165Y, а также в позициях 229 – валин на аланин и 172 – лизин на глутамин (L172Q), 229 – (G229D).

Из 17 исследуемых нами штаммов вируса гриппа В сезона 2012-2013гг. 13 принадлежали к В/Ямагатской линии и по своему генетическому строению были близки эталону В/Висконсин/1/2010. Большая часть вирусов несла аминокислотные замены в 2 позициях: 48 (R48K) и 182 – замена треонина на аланин (T182A). Несколько штаммов несли изменения в двух антигенных областях: в петле 150 - S150I и в петле 190 - N202S, а также в позициях 108 (P108A) и 229 (G229D). Два штамма В/Томск/02/2013 и В/Ярославль/1/2013 имели в своем составе замены в позициях 298 – лизин на глутаминовую кислоту (K298E) и 312 – глутаминовая кислота на лизин (E312K). У четырех штаммов (В/Москва/2/2013, В/Москва/44/2013, В/Москва/78/2013, В/Москва/91/2013) В/Викторианской линии и близкородственных эталону В/Брисбен/60/2008, были выявлены аминокислотные замены в позиции 202 в спирали 190 (A202E), 75 (N75K), 172 (S172P) и 58 (L58P), N165K в петле 160, V146I в петле 150 и N197D – замена аспарагина на аспарагиновую кислоту, связанную с потерей потенциального сайта гликозилирования.

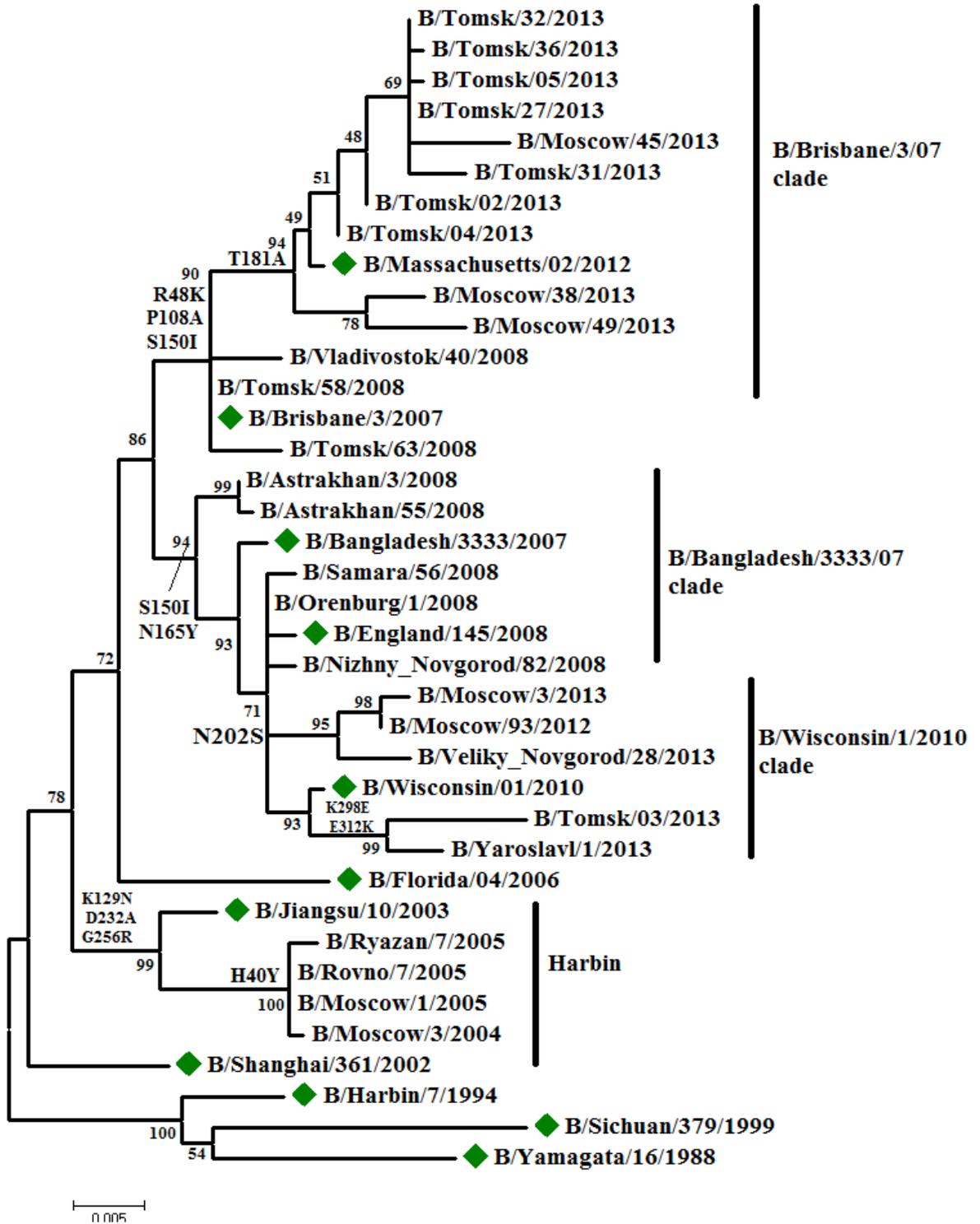
Таким образом, полученные результаты исследований последовательностей НА вируса гриппа В двух эволюционных линий – В/Ямагатской и В/Викторианской, позволили установить, что аминокислотные изменения затронули как субмолекулу НА1, так и субмолекулу НА2. В молекуле НА1 мутационные изменения затронули все четыре антигензначимые области. Однако наибольшему действию позитивной селекции подверглись петли 120,150 и 160 у вирусов В/Викторианской линии и петли 120 и 150 у вирусов гриппа В/Ямагатской линии. Также, в последовательностях НА штаммов В/Викторианской линии 2012-2013 гг. была отмечена замена N197D, связанная с потерей потенциального сайта гликозилирования.

**3.3.3. Филогенетический анализ последовательностей гемагглютинина эпидемических штаммов вируса гриппа В/Ямагатской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.**

На Рис.12 представлено филогенетическое дерево последовательностей гемагглютинина штаммов вируса гриппа В/Ямагатской линии, изученных в период с 2003 по 2013 гг. Штаммы, циркулировавшие с 2004 по 2006 гг., принадлежали субгруппе Харбин и были близки референс штамму В/Цзянсу/10/2003, обладая заменами K129N, D323A, G256R. Вторая филогенетическая группа была представлена эталонным вариантом В/Бангладеш/3333/2007, референс-штаммом В/Англия/145/2008 и несла характерные замены S150I и N165Y.

Штаммы, циркулирующие в сезоне 2012-2013 разделились на две филогенетические группы: первая группа В/Висконсин/1/10 несла замену N202S; вторая группа В/Массачусетс/02/2012 несла специфические для клада аминокислотную замену T181A.

Таким образом, сравнительный анализ последовательностей гемагглютинина вирусов гриппа В/Ямагатской линии показал их близкое филогенетическое родство с эталонными вариантами, которые были рекомендованы экспертами ВОЗ в качестве вакцинных в соответствующие сезоны.



◆ - эталонные штаммы

Рис. 9. Филогенетическое сравнение последовательностей гемагглютинина вирусов гриппа В Ямагатской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.

### **3.3.4. Филогенетический анализ последовательностей гемагглютинина эпидемических штаммов вируса гриппа В/Викторианской линии, циркулировавших в период 2003-2013 гг.**

На Рис. 13 представлено филогенетическое дерево последовательностей гемагглютинина штаммов вируса гриппа В/Викторианской линии. Первая группа представлена штаммами-реассортантами между двумя эволюционными линиями, которые несли гемагглютинин от В/Викторианской линии, а нейраминидазу от В/Ямагатской. Штаммы 2003-2004 гг. отмечались общей заменой I121T, в тоже время, В/Хабаровск/57/2005 нес замену I180V.

Вторая группа штаммов вируса гриппа В входила в клайд В/Малайзия/2506/2004 с характерными для него заменами K48E, K80R и K129N. Последовательности НА штаммов вируса гриппа В, представляющие третий генетический клайд В/Брисбан/60/08, имели в своём составе характерные замены N75K, V146I и N165K.

Таким образом, филогенетический анализ последовательностей гемагглютинина вирусов гриппа Викторианской линии, циркулирующих на территории России с 2003 по 2013 гг. показал их близкое родство с эталонными вариантами, которые были рекомендованы экспертами ВОЗ в качестве вакцинных в соответствующие сезоны.

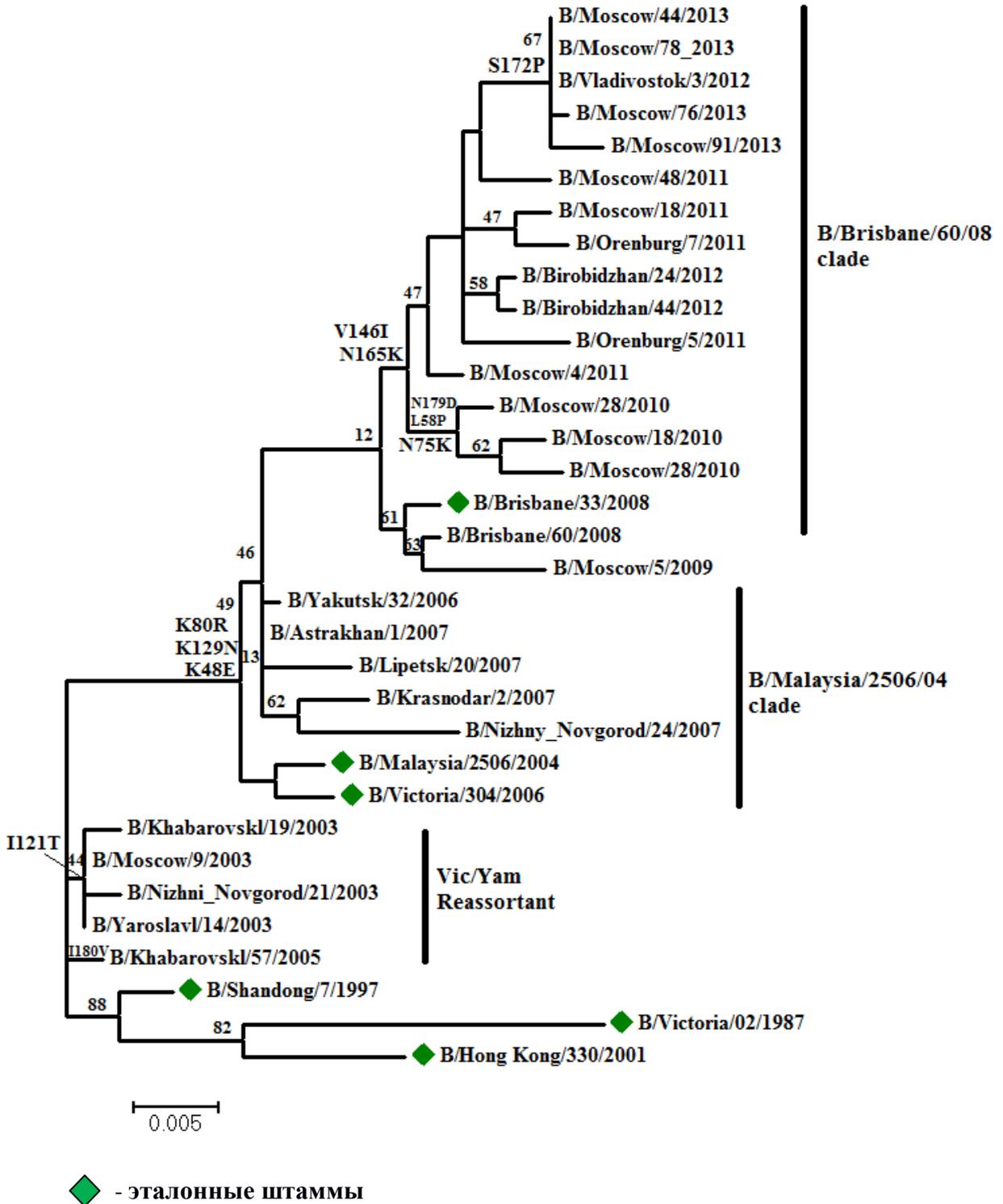


Рис. 10. Филогенетическое сравнение последовательностей гемагглютинина вирусов гриппа В Викторианской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.

### 3.4. Молекулярно-генетический анализ гена NA эпидемических штаммов вируса гриппа В.

#### 3.4.1. Подбор универсальных праймеров для амплификации и секвенирования полноразмерных последовательностей гена NA эпидемических штаммов вируса гриппа В.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей нейраминидазы штаммов вируса гриппа В не показал различий в строении между двумя эволюционными линиями (В/Ямагатской и В/Викторианской), поэтому было подобрано три пары праймеров, которые также содержали нуклеотидные последовательности, комплиментарные праймерам M13F и M13R: первая пара 21F-645R на начало сегмента, вторая пара на середину 537F-1096R и третья пара 896F-1471R на конец сегмента. Реакцию секвенирования трёх полученных фрагментов проводили с двух универсальных праймеров M13F и M13R.

**Таблица 20**

**Праймеры первого раунда ПЦР для амплификации фрагментов  
нейраминидазы вируса гриппа В**

Нейраминидаза	
Название праймера	Последовательность праймера
21F	tgtaaacgacggccagtCAAATAGGCCAAAAATGAACAA
896F	tgtaaacgacggccagtTGCCAGCAATAAAACCATAGAA
537F	tgtaaacgacggccagtGCAAAATCCCAACAGTAGAAAA
744R	caggaaacagctatgaccAATTGCAGGCACTTTCTTGT
645R	caggaaacagctatgaccTGTCAGGGCCATCAACTC
1096R	caggaaacagctatgaccATGCCTCCACTCCCCTTGT
1106R	caggaaacagctatgaccCCTCCCTTGATGCCTCCAC
892R	caggaaacagctatgaccCATGTGCATTTCCTCCAGTGTGT
1471R	caggaaacagctatgaccACTCAACCATTTCCTCCATTACAG

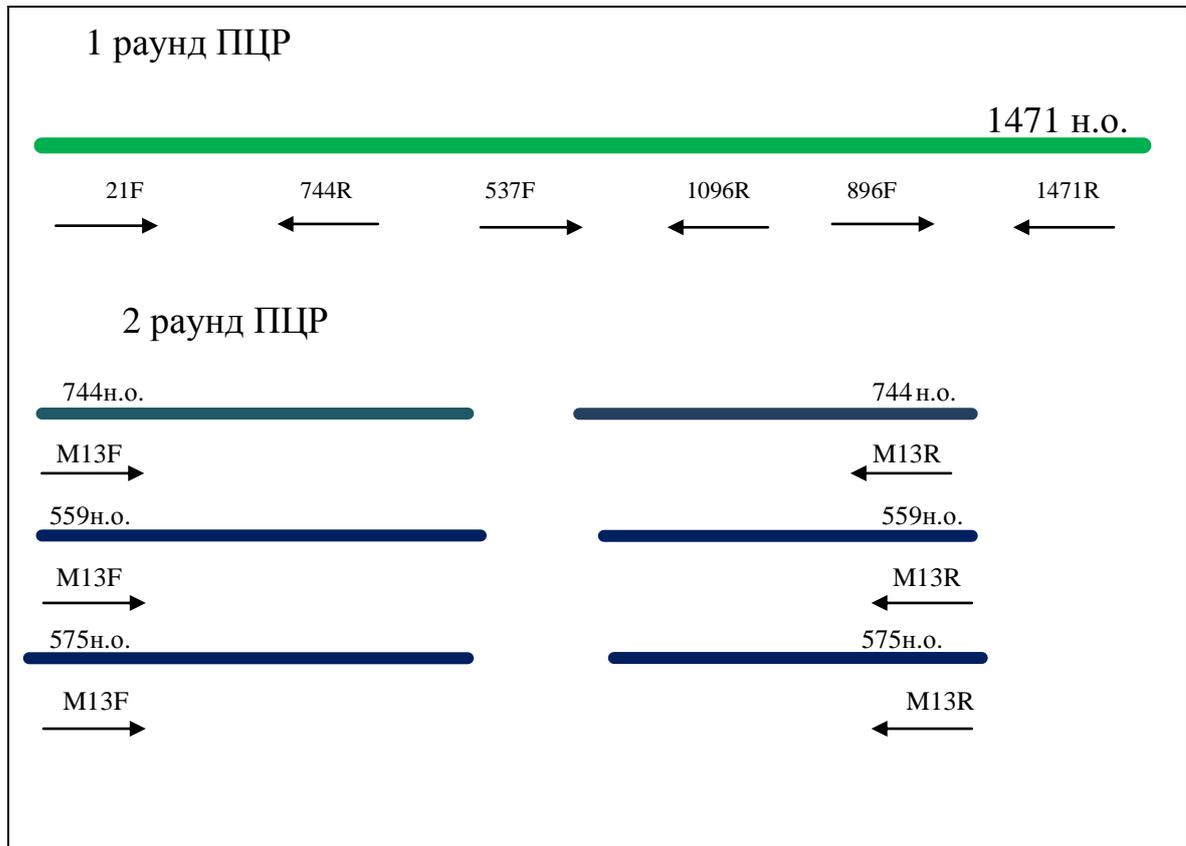


Рис.11. Подбор праймеров для амплификации нейраминидазы вируса гриппа В.

### 3.4.2 Анализ аминокислотной последовательности нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа В, циркулировавших в 2003-2013гг.

Для настоящего исследования были отобраны 4 штамма вируса гриппа В 2003-2004гг.: В/Москва/9/2003, В/Ярославль/14/2003, В/Хабаровск/19/2003 и В/Нижний Новгород/21/2003. Молекулярно-генетический анализ последовательностей гемагглютинина этих вирусов показал, что они относились к В/Викторианской линии, однако по аминокислотному составу последовательностей нейраминидазы эти штаммы оказались близки эталонному штамму В/Сичуань/379/1999, который принадлежал к В/Ямагатской линии. Все последовательности NA несли характерные для эталона замены в позициях: 198 – серин на аспарагин (S198N), 389 – треонин на аланин (T389A), 148 – глутаминовая кислота на глицин (E148G). Полученные нами данные показали, что сезон 2003 - 2004 характеризовался циркуляцией реассортантов вирусов гриппа В, которые с одной стороны имели в своем составе гемагглютинин от В/Викторианской линии (вирусы подобные В/Гонконг/330/2001), а нейраминидазу от В/Ямагатской линии (вирусы подобные В/Сичуань/379/1999).

Штаммы В/Москва/1/2005 и В/Москва/2/2004 эпидемического сезона 2004-2005гг. по генетическому строению последовательностей нейраминидазы относились к В/Ямагатской линии и были близкородственны эталону В/Шанхай/361/2002. Московские штаммы отмечались характерными для эталона заменами в позициях 42 – пролин на треонин (P42T), 342- аспарагиновая кислота на аспарагин (D342N), лейцин на фенилаланин (L73F). Штаммы В/Хабаровск/57/2005 и В/Ярославль/13/2005 также принадлежали В/Ямагатской линии с характерной заменой в позиции 248 (I248V).

В молекуле нейраминидазы штамма В/Якутск/32/2006 сезона 2005-2006, который был подобен вакцинному штамму В/Малайзия/2506/2004 В/Викторианской линии были найдены изменения, затронувшие ряд позиций, таких как 248 (I248V), 271 – валин на изолейцин (V271I), 396 – лизин на фенилаланин (L396F), 463 – аспарагиновая кислота на аспарагин (D463N), 125 – лизин на аспарагин (K125N), 373 – лизин на глутаминовую кислоту (K373E), 404 – глутаминовая кислота на лизин (E404K).

Три штамма вируса гриппа, выделенные в эпидемическом сезоне 2006-2007 гг. по молекулярному строению относились к В/Викторианской линии и были подобны вакцинному штамму В/Малайзия/2506/2004. Они несли многочисленные замены, такие как N202K – аспарагин на лизин, E320D – глутаминовая кислота на аспарагиновую кислоту, E404K, K125N – лизин на аспарагин, I128V, K373E, L396F, S41P – серин на пролин, E148G – глутаминовая кислота на глицин, S198N, T389A – треонин на аланин, R186K- аргинин на лизин, D235N – аспарагиновая кислота на аспарагин, E272K – глутаминовая кислота на лизин, K436E – лизин на глутаминовая кислота, K250E – лизин на глутаминовую кислоту.

Генетический анализ последовательностей нейраминидазы штаммов вируса гриппа В, выделенных в 2007-2008гг., показал, что все они относились к В/Ямагатской линии, и были подобными В/Флорида/04/2006 с характерными аминокислотными заменами в позиции 49 - треонин на изолейцин (T49I), 244 –

серин на пролин (S244P), 250 (K250E), 329 - аспарагиновая кислота на аспарагин - (D329N), 392 – аспарагиновая кислота на глутаминовую кислоту (D392E), 436 – глутаминовая кислота на треонин (E436T). Часть штаммов несли замены T68A – треонин на аланин, K125T – лизин на треонин, R186K, D463N- аспарагиновая кислота на аспарагин, связанную с приобретением потенциального сайта гликозилирования, A465T – аргинин на треонин, Q42R – глутамин на аргинин, N340D – аспарагин на аспарагиновую кислоту, L396F – лизин на фенилаланин.

Штаммы В/Москва/5/2009 и В/Москва/6/2009, изолированные в 2008-2009гг., относились к дрейф-вариантам эталонного штамма В/Малайзия/2506/2004, т.к. несли замены V271I, S41P, P42S – замена пролина на серин, D329N - аспарагиновая кислота на аспарагин, A358E – аланин на глутаминовую кислоту, E320D, характерны для В/Брисбан/60/2008.

В изучаемых нами последовательностях NA вирусов гриппа В/Викторианской линии, выделенных в 2009- 2010гг., были найдены аминокислотные изменения, свойственные новому эталонному штамму В/Брисбен/60/2008: I204V– изолейцин на валин, A358E – аланин на глутаминовую кислоту и N220K – аспарагин на лизин, а также замены E320D, E404K, N329D.

Штаммы В/Москва/18/2011, В/Москва/48/2011, В/Москва/4/2011 и В/Оренбург/7/2011 сезона 2010-2011 гг. по своему аминокислотному составу были подобны вакцинному штамму В/Брисбан/60/2008 В/Викторианской линии со свойственными для него заменами: E404K, N463D – аспарагин на аспарагиновую кислоту, I204V, N220K, P41S – пролин на серин, E320D, A358E. В/Москва/48/2011 и В/Москва/4/2011 отличались от эталонного штамма в трёх позициях: 27 – серин на лизин (S27L), 199 – аспарагин лизин (N199D), 51 – пролин на серин (P51S).

Молекулярно-генетическое исследование молекул NA штаммов вируса гриппа В эпидемического сезона 2011-2012гг. показало, что В/Москва/93/2012 был близкородственен эталонному штамму В/Висконсин/1/2010 В/Ямагатской линии отмечаясь заменами в следующих позициях: 343 – лизин на глутаминовую

кислоту (K343E), D463N&A465T, которые связаны с приобретением потенциального сайта гликозилирование, Q42R, A68T – аланин на треонин, T125K – треонин на лизин, D340N - аспарагиновую кислота на аспарагин и K186R. Штамм В/Красноярск/1/2012 был подобен вакцинному штамму В/Брисбан/60/2008 Викторианской линии с заменами в позициях: 73 – лизин на пролин (L73P), 404 (E404K), 320 (E320D), 295 – серин на аргинин (S295R), 358 – глутаминовая кислота на лизин (E358K), 340 (N340D), 248 (I248V), 329 (D329N), 42 (S42P), 217 – изолейцин на валин (I217V), 204 (I204V).

Из 17 изученных нами последовательностей NA вирусов гриппа В, выделенных в сезоне 2012-2013гг., 13 по своему генетическому строению относились к В/Ямагатской линии и были подобны эталону В/Массачусетс/02/2012. Большинство штаммов имели замены I248V, T106I, S295R, S198N – серин на аспарагин, W456G – триптофан на глицин, R65H – аргинин на гистидин, A358T, L73P. Небольшая часть штаммов несла замены, присущие вакцинному штамму В/Висконсин/1/2010 в 7 позициях: Q42R, A68T, T125K, K186R, D340N, D463N, A465T. Последние две замены, как правило, встречаются вместе и связаны с приобретением потенциального сайта гликозилирования.

Анализ последовательностей нейраминидазы штаммов В/Москва/2/2013, В/Москва/44/2013, В/Москва/76/2013, В/Москва/78/2013 и В/Москва/91/2013 показал, что они принадлежали филогенетическому клайду В/Брисбен/60/2008 В/Викторианской линии с характерными аминокислотными заменами R41S, S42P, I204V, N220K, E320D, D329N, E404K. Все штаммы приобрели новую замену в позиции 358 - глутаминовая кислота на лизин (E358K). В/Москва/76/2013 и В/Москва/91/2013 несли замены L73F - лизин на фенилаланин и N340D. Также штамм В/Москва/76/2013 нес дополнительные замены в позициях 345 - серин на аспарагин (S345N) и 463 – аспарагин на аспарагиновую кислоту (N463D).

Таким образом, в последовательностях нейраминидазы штаммов вируса гриппа В двух эволюционных линий в период с 2003 по 2013 гг. было

выявлено значительное количество аминокислотных замен, которые затронули всю последовательность NA. У штаммов В/Ямагатской линии, циркулировавших в 2011-2013 гг., были найдены замены D463N&A465T, связанные с приобретением потенциального сайта гликозилирования.

Молекулярно-генетический анализ последовательностей нейраминидазы у исследованных нами штаммов на наличие мутаций E119G, D198N, D198E, ответственных за резистентность к противовирусным препаратам, озельтамивиру и занамивиру, не выявил.

### **3.4.3 Филогенетический анализ последовательностей нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа В/Ямагатской линии, циркулировавших в период 2003-2013 гг.**

Последовательности NA штаммов вируса гриппа В, циркулирующих в период с 2003 по 2005 гг. относились к генетической сублинии В/Сичунь. Штаммы В/Хабаровск/19/2003, В/Нижний Новгород/21/2003, В/Ярославль/14/2003, В/Москва/9/2003 и В/Хабаровск/57/2005 являлись реассортантами между двумя эволюционными линиями (рис. 15).

Штаммы В/Москва/1/2005 и В/Москва/3/2004 филогенетически были близки эталонным штаммам В/Цзянсу/10/2003 и В/Шанхай/361/2002 .

Вторая генетическая группа В/Бангладеш/3333/2007 несла последовательности нейраминидазы, которые отмечались характерной заменой Q42R. Последовательности NA штаммов, циркулировавших в 2012-2013 гг. принадлежали двум филогенетическим группам: В/Брисбен/07 с заменой R65H, характерной для референс-штамма В/Массачусетс/02/12, а также T106I и S295R и В/Висконсин/1/10 со специфическими заменами D463N и A465T.

Проведённый филогенетический анализ последовательностей NA вирусов гриппа В/Ямагатской линии, циркулирующих на территории России с 2003 по 2013 гг. показал их близкое родство с эталонными вариантами, которые были рекомендованы в качестве вакцинных в соответствующие сезоны.

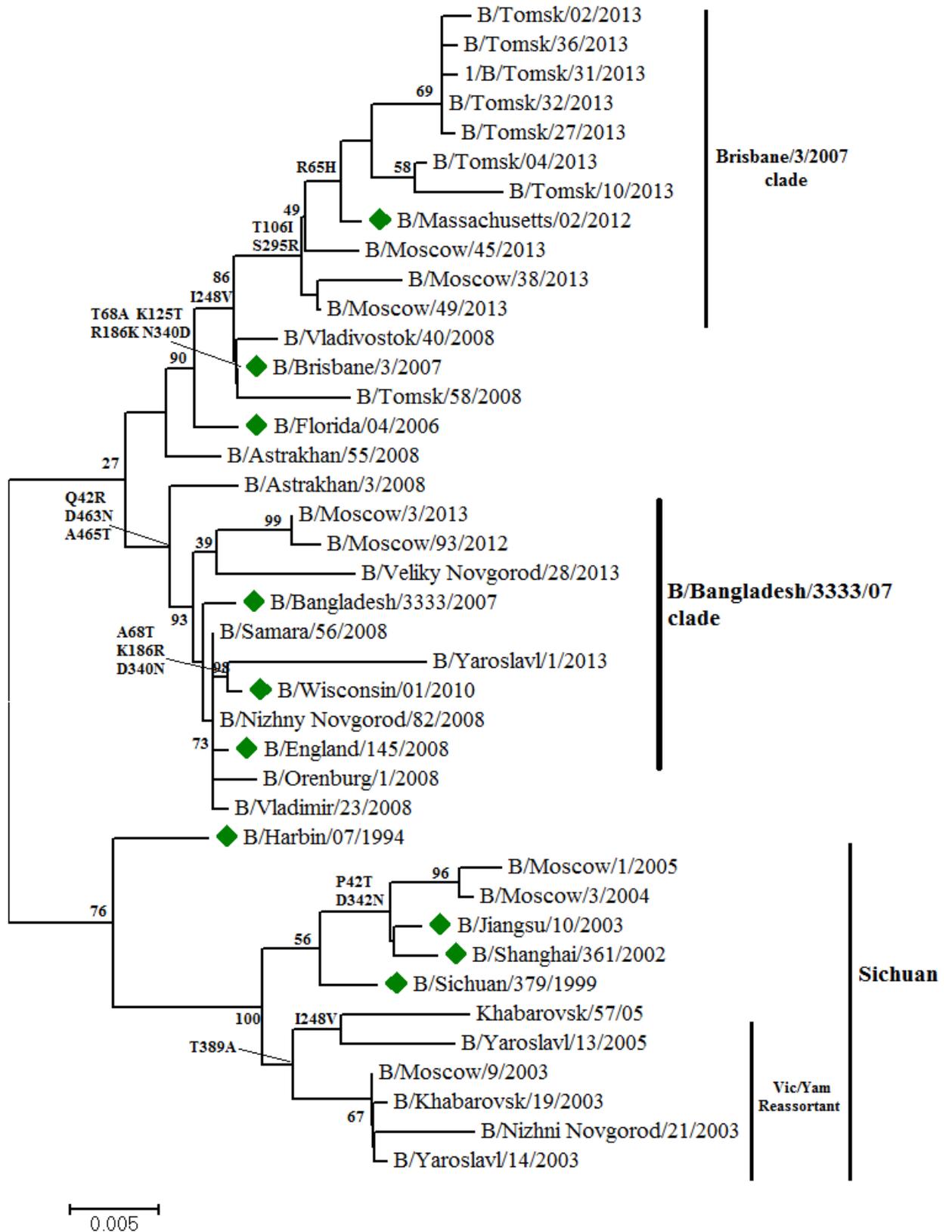


Рис. 12. Филогенетическое сравнение последовательностей нейраминидазы вирусов гриппа В/Ямагатской линии, циркулировавших в период 2003-2013гг.

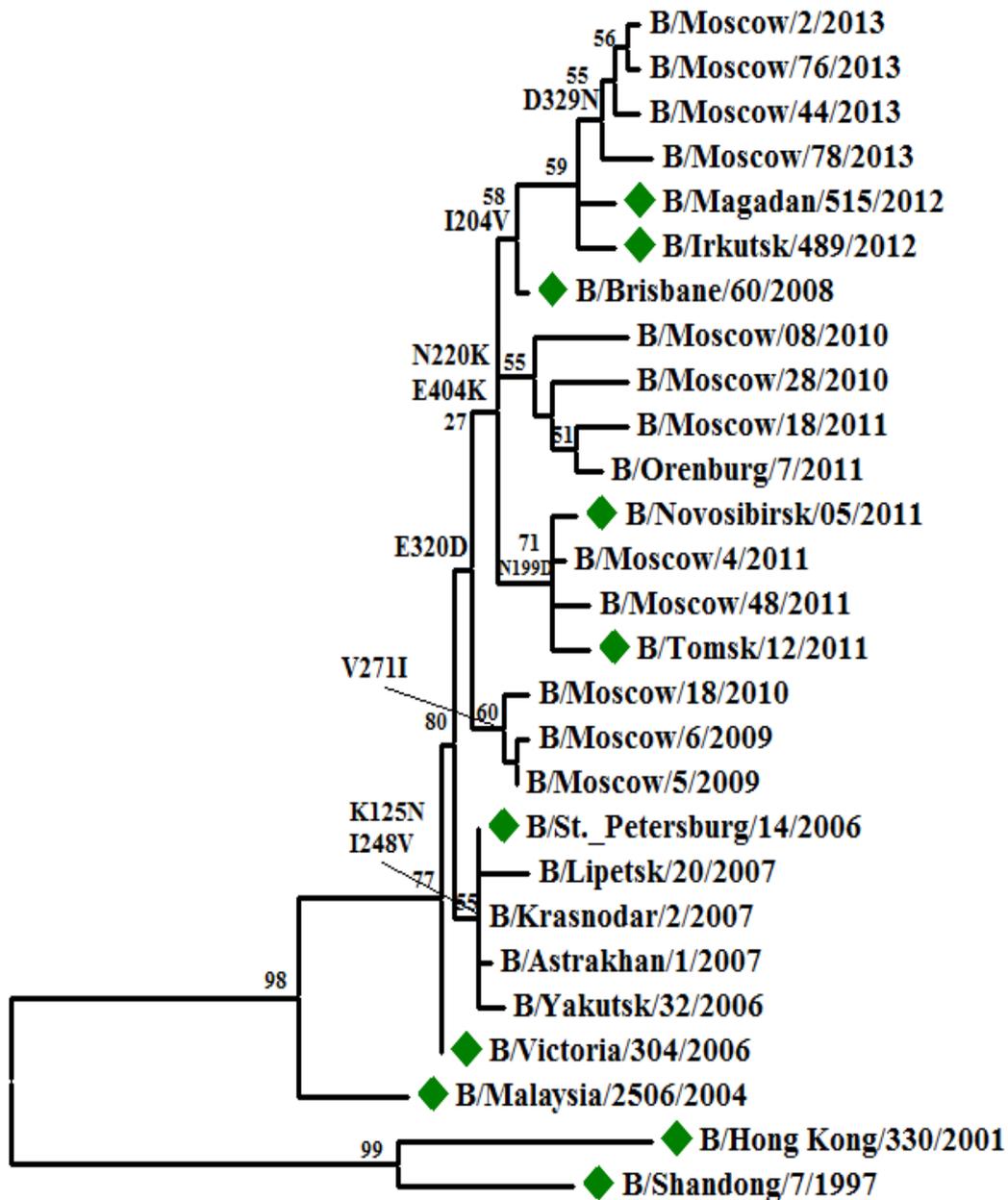
#### **3.4.4 Филогенетический анализ последовательностей нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа В/Викторианской линии, циркулировавших в период 2003-2013 гг.**

На рис. 16 представлено филогенетическое дерево последовательностей NA штаммов вируса гриппа В Викторианской линии. Штаммы 2006-2007 гг. филогенетически были близки референс-штамму В/Виктория/304/2006 (филогенетическая группа В/Малайзия/2506) с характерными заменами K145N и I248V. Последовательности NA штаммов 2008-2010 гг. образовали отдельную генетическую группу с общей заменой V271I.

Вирусы гриппа В 2009-2011 гг. несли две общие аминокислотные замены N220K и E404K, характерные для клайда В/Брисбен/60/2008.

Группа штаммов 2012-2013 гг. филогенетически была близка эталонному штамму В/Брисбан/60/08 и отмечалась специфическими для данного клайда заменами I204V и D329N.

Так, филогенетическое сравнение последовательностей нейраминидазы вирусов гриппа В/Викторианской линии, циркулирующих на территории России с 2003 по 2013 гг. показало их близкое родство с эталонными вариантами, которые были рекомендованы экспертами ВОЗ в качестве вакцинных в соответствующие сезоны, а также с последовательностями NA других российских штаммов.



◆ - эталонные штаммы

Рис. 13. Филогенетическое сравнение последовательностей нейраминидазы вирусов гриппа В/Викторианской линии, циркулировавших в период 2003-2013 гг.

### **3.5. Модификация лабораторного варианта тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для дифференциации эволюционных линий гриппа В.**

Дифференциация штаммов вируса гриппа В по двум эволюционным линиям является актуальной задачей, т. к. в состав гриппозной вакцины входит представитель только одной эволюционной линии. Возможность быстро определять принадлежность штаммов вируса гриппа к эволюционным линиям (В/Виктория/2/87-подобных и В/Ямагата/16/88-подобных) методом ПЦР-РТ позволяет усовершенствовать диагностику, расширить мониторинг циркуляции вирусов гриппа В, а также определить соответствие циркулирующих штаммов свойствам вакцинных вирусов на территории Российской Федерации.

Для решения этой задачи была модифицирована тест-система для дифференциации эволюционных линий вируса гриппа В, разработанная Барбарой Бьер в 2010 г., необходимость в которой была связана с отсутствием подобных коммерческих систем в РФ. Т.к. участок НА, на который были подобраны зонды, российских штаммов вируса гриппа В имел отличия от последовательности НА штаммов, подобранных для разработанной тест-системы, для исследований необходимо было модифицировать праймеры зондов. Нуклеотидные последовательности гемагглютининов штаммов вируса гриппа В российских и зарубежных штаммов периода 2003-2013 гг., доступных в базе данных GenBank, были выровнены с использованием пакета программ Lasergene Core Suite по алгоритму ClustalW. Был найден вариабельный участок (80 н.о.), который был выбран для подбора зондов.

Кроме того был заменен краситель VIC, предлагаемый в разработанной тест-системе на 6-карбоксихлорофлуоресцин (FAM), используемый для детекции вирусов гриппа В/Викторианской линии.

Праймеры, используемые для амплификации были универсальными и подошли для всех исследуемых российских штаммов.

Оптимальные условия для отжига праймеров и зондов в ОТ-ПЦР-РВ были подобраны эмпирически и составили 55°C. ПЦР смесь готовили в объеме 25 мкл: 12,5 мкл 2xmix (Bio-Rad) , по 0,25 мкл праймеров IBHF (тб.5) и IBHR, по

0,125 мкл зондов IBHYpr и IBHVpr, 9,5 мкл H<sub>2</sub>O, 2,5 мкл кДНК. ПЦР проводили в приборе S 1000 Thermo Cycler (BIO-RAD) с режимом 95°C – 3 минуты 95°C - 10 секунд 55°C – 30 секунд 39 циклов.

Модифицированный вариант тест-системы был изучен с использованием панели вирусов гриппа В, полученной из коллекции вирусов лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ, а также образцов носоглоточных смывов от пациентов, поступивших в Инфекционную больницу №1, которая является опорной базой ЦЭЭГ.

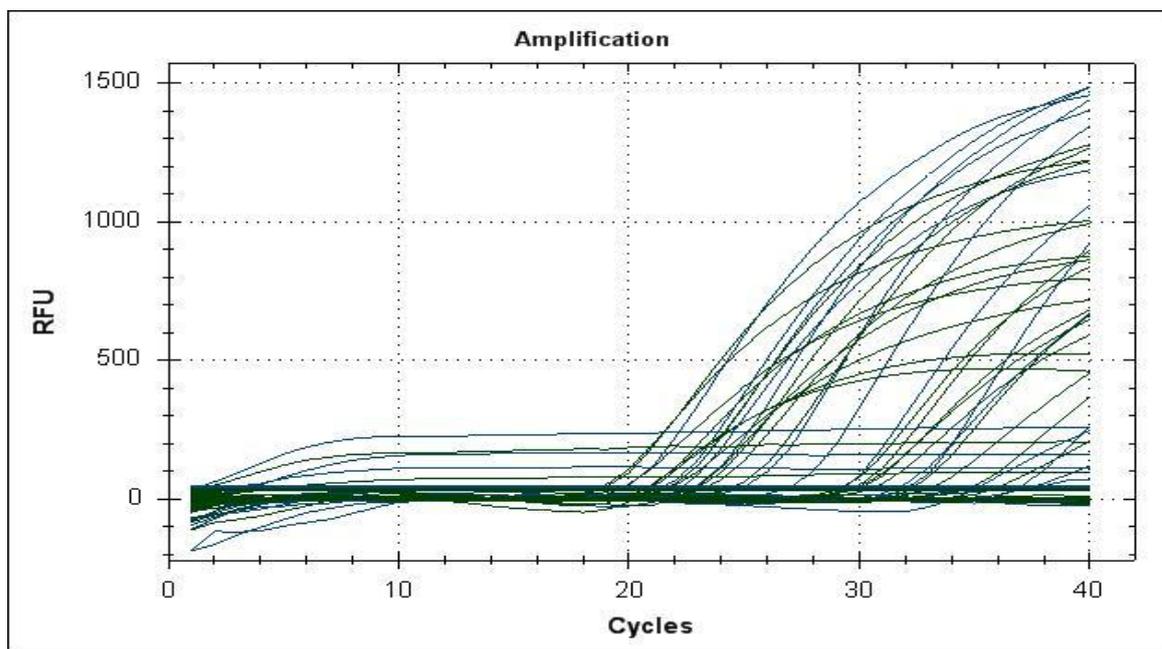
Таблица 14

**Праймеры и зонды лабораторного варианта тест-системы для дифференциации штаммов вируса гриппа В**

Праймеры и зонды	Место посадки	Последовательность
IBHYpr	547	HEX-CGAAAAATCCGMTYTTACTGGTAG-BHQ1
IBHVpr	543	FAM-AAATCCGTTTCCATTGGTAATGT-BHQ1
IBHF	486	ACCCTACARAMTTGGAACYTCAGG
IBHR	566	ACAGCCCAAGCCATTGTTG

Полученные данные были интерпретированы по кривым флуоресценции - зависимости флуоресцирующего сигнала FAM или HEX (в зависимости от красителя) от цикла реакции (рис. 8). Анализ результатов показал, что двадцать исследуемых штаммов вируса гриппа В дали положительный результат: шесть штаммов принадлежали к В/Викторианской линии и тринадцать - к В/Ямагатской линии. Детекция флуоресцирующего сигнала у вирусов гриппа В наблюдали в районе 20-25 циклов. Четырнадцать исследуемых носоглоточных смывов также дали положительный результат: из них семь смывов были

отнесены к В/Викторианской линии и семь - к В/Ямагатской линии. Носоглоточные смывы детектировали в районе 30-35 циклов (таб. 15).



**Рис. 14. Кривые флуоресценции, полученные с использованием специфических зондов IBHУpr и IBHVpr, меченных красителями FAM и HEX на амплификаторе S 1000 ThermoCycler (BIO-RAD)**

**Таблица 15**

**Результаты ПЦР-РВ, полученные с использованием лабораторных тест-систем, и их интерпретация**

Образцы кДНК исследуемых штаммов и смывов	Флуороформ	Цикл	Принадлежность к эволюционным линиям вируса гриппа В
В/Оренбург/1/2008 *	FAM	-	В/Виктория
	HEX	21,49	
В/Ровно/7/2005	FAM	29,68	В/Ямагата
	HEX	-	
В/Москва/18/2011	FAM	22,02	В/Виктория
	HEX	-	
В/Москва/2/2013	FAM	21,77	В/Виктория

	HEX	-	
В/Астрахань/1/2007	FAM	20,09	В/Виктория
	HEX	-	
В/Краснодар/2/2007	FAM	22,51	В/Виктория
	HEX	-	
В/Томск/03/2013	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	20,52	
В/Москва/1/2005	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	29,51	
В/Томск/13/2013	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	19,45	
В/Самара/56/2008	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	18,38	
В/Нижний Новгород/82/08	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	23,03	
В/Ярославль/1/2013	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	20,60	
В/Владивосток/40/2008	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	22,72	
В/Оренбург/7/2011	FAM	25,27	В/Виктория
	HEX	-	
В/Москва/45/2013	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	20,85	
В/Владивосток/3/2012	FAM	23,10	В/Виктория
	HEX	-	
В/Томск/58/2008	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	22,52	
В/Астрахань/55/2008	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	24,16	
В/Рязань/7/2005	FAM	-	В/Ямагата

	HEX	18,59	
В/Москва/38/2013	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	21,32	
Пациент №1999** (2012 г.)	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	29,37	
Пациент №1991 (2012 г.)	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	35,65	
Пациент №1224 (2012 г.)	FAM	35,50	В/Виктория
	HEX	-	
Пациент №2049 (2012 г.)	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	32,12	
Пациент №757 (2012 г.)	FAM	32,39	В/Виктория
	HEX	-	
Пациент №766 (2012 г.)	FAM	37,21	В/Виктория
	HEX	-	
Пациент №1212 (2012 г.)	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	32,84	
Пациент №1473 (2012 г.)	FAM	38,06	В/Виктория
	HEX	-	
Пациент №1941 (2012 г.)	FAM	29,56	В/Виктория
	HEX	-	
Пациент №1508 (2012 г.)	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	34,43	
Пациент №710 (2012 г.)	FAM	-	В/Ямагата
	HEX	29,02	
Пациент №1448 (2012 г.)	FAM	27,27	В/Виктория
	HEX	-	
Пациент №1478 (2012 г.)	FAM	32,04	В/Виктория
	HEX	-	
Пациент №2158 (2012 г.)	FAM	-	В/Ямагата

	HEX	30,27	
--	-----	-------	--

\*-штамм вируса гриппа В, \*\*- смыв от пациента

Также аналогичные образцы носоглоточных смывов, которые были протестированы лабораторным вариантом тест-системы, детектировали другой тест-системой фирмы “ДНК-Технологии”. Результаты исследования представлены в табл. 17.

**Таблица 16**

**Температуры плавления продуктов амплификации, определяющие генотипы вирусов гриппа В**

Полиморфизм	FAM/FAM			HEX/HEX			FAM/ HEX		
	Генотип	FAM °C	HEX °C	Генотип	FAM °C	HEX °C	Генотип	FAM °C	HEX °C
Линии гриппа В	Yam	57,7	35,0	Vic	37,0	57,0	смесь	57,7	57,0

В табл. 16 показана методика интерпретации результатов, которая проходит по графикам зависимости сигнала флуоресценции канала FAM или HEX от температуры плавления.

**Таблица 17**

**Результаты ПЦР-РВ, полученные с использованием тест-системы ДНК-технологии**

Номер образца	Флуороформ	Температура плавления		Анализ полиморфизмов
		Канал		
		FAM	HEX	
Пациент №1999* (2012 г.)	HEX	58,1	35,0	В/Ямагата

Пациент №1991 (2012 г.)	HEX	57,4	34,5	В/Ямагата
Пациент №1224 (2012 г.)	FAM	36,7	57,1	В/Виктория
Пациент №2049 (2012 г.)	HEX	57,7	34,8	В/Ямагата
Пациент №757 (2012 г.)	FAM	36,7	56,9	В/Виктория
Пациент №766 (2012 г.)	FAM	36,6	56,2	В/Виктория
Пациент №1212 (2012 г.)	HEX	57,7	34,6	В/Ямагата
Пациент №1473 (2012 г.)	FAM	36,6	55,7	В/Виктория
Пациент №1941 (2012 г.)	FAM	36,7	57,4	В/Виктория
Пациент №1508 (2012 г.)	HEX	57,6	34,7	В/Ямагата
Пациент №710 (2012 г.)	HEX	58,3	36,1	В/Ямагата
Пациент №1448 (2012 г.)	FAM	36,7	57,4	В/Виктория
Пациент №1478 (2012 г.)	FAM	36,7	57,3	В/Виктория
Пациент №2158 (2012 г.)	HEX	57,9	35,0	В/Ямагата

\*- смыв от пациента.

Результаты ПЦР в реальном времени интерпретировали по графику зависимости флуоресцирующего канала FAM от температуры плавления ( $dF/dT$ ) по принадлежности образца к В/Ямагатской линии или графику зависимости

флуоресцирующего канала HEX от температуры плавления - к В/Викторианской линии. Таким образом, как показано в таблице 17 результаты, полученные тест-системой ДНК-технологии, совпадали с теми, которые были получены нашей тест-системой: семь образцов принадлежали к В/Викторианской линии и семь - В/Ямагатской (таб.17). Можно сказать, что две изучаемые нами тест-системы успешно детектировали эволюционные линии вирусов гриппа В.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие и внедрение молекулярно-генетических методов изучения структуры и свойств белков вирусов гриппа в последние годы способствовали более полному пониманию механизмов их эволюционной изменчивости. Внедрение этих методов позволило в определенной степени предупредить возможный ущерб, а также оценить эффективность вакцинопрофилактики и лечения с помощью этиотропных препаратов (Nelson M. et al., 2008)

Интенсивное изучение молекулярной эволюции вирусов гриппа предоставляет важную информацию по сезонному генезису и распространению их среди людей (Laver W. et al., 1968, Sleight M. et al., 1981, Fitch W. et al., 1991, Bush R., 1999). Быстрота с которой пандемии и эпидемии вируса гриппа А возникают и распространяются по всему миру также вызывает большой интерес в понимании их пространственно-временной динамики (Rvachev L. et al., 1968, Bonabeau E. et al., 1998, Grais R., et al. 2003). Каждый год, вирусы гриппа вызывают эпидемии в обход уже существующему гуморальному иммунитету с помощью эволюционных изменений (антигенный дрейф) в двух основных гликопротеинах : гемагглютинине (НА) и нейраминидазе ( NA ), т.к. именно они являются основными целями для антител. Поэтому большинство исследований молекулярно-генетического строения НА и NA посвящено их эволюционным изменениям, в результате появления новых значимых мутаций.

В первые годы после появления вирусов гриппа А(Н3N2) в организме человека было найдено несколько изменений в последовательностях НА,

которые менялись от одного эпидемического сезона к другому. В течении первых десяти лет (1968-1979), молекула HA1 накопила 33 аминокислотных изменений, однако вакцины менялись всего три раза. Wilson и Cox предположили, что эпидемиологически важные дрейф - варианты обычно несут четыре или несколько аминокислотных замен, расположенные в двух или более антигенных сайтов в протеине HA1 (Thompson W., 2004, Shih et al., 2004), а также высказали предположение, что новые антигенные варианты образуются, когда встречаются более, чем две мутации в антигенных сайтах, либо когда одна мутация появляется в одном антигенном сайте HA и одна в NA (Ina Y. et al., 1994). В последние годы вакцинные штаммы меняются более часто, хотя изменений в циркулирующих вирусах встречается меньше. К примеру, последовательные различия между вирусами подобными A/Висконсин/67/2005 вирусами подобными A/Брисбан/10/2007 G50E в сайте E и K140I в сайте A были достаточны для того чтобы сменить вакцинный компонент H3N2 в сезоне 2008-2009 (WHO, 2008-2009).

Результаты молекулярно-генетических исследований трех белков (HA, NA и M) изученных нами вирусов гриппа A(H3N2) показали, что в период с 2003 г. по 2013 г. в строении HA и NA происходили ежегодные изменения, и аминокислотные замены регистрировали как в 5 сайтах связывания антител (A, B, D, E), так и во всей молекуле HA, а также в молекуле NA и белке M.

Генетическая и филогенетический анализ вирусов гриппа A (H3N2), циркулирующие на территории Российской Федерации в течение десяти лет, с 2003-2013 подтвердил, что генетический состав вирусов гриппа A может меняться от года к году.

Филогенетические деревья HA и NA демонстрировали как сезонные кластеры, так и социркулирующие линии внутри эпидемических сезонов. Как показали исследования, посвященные вирусу гриппа A (H3N2), в начале 2000-х годов в мире циркулировали штаммы подобные A/Нью Йорк/55/01 (Bragstad K., 2008). Однако в сезоне 2003-2004 года появление вирусов подобных A/Фуцзян/411/02 привело к так называемому «прыжку» в эволюции вирусов

H3N2 и они полностью заменили штаммы, циркулирующие в предыдущем сезоне, социркулируя с вирусами подобными А/Веллингтон/1/04. Согласно эти данные с данными, полученными нами можно увидеть, что на территории России в этот период также циркулировали штаммы, подобные А/Фуцзян/411/02 и А/Веллингтон1/04. Вирусы подобные А/Фуцзян/411/02 отличались от вирусов подобных А/Нью Йорк/55/01 несколькими заменами в молекуле НА, причём наибольший уровень изменений затронул сайт В (Y159F, S189N), что показывает, что именно этот сайт был предпочтительным для изменений в этот период. Интересно, что, хотя наши штаммы были филогенетически и молекулярно-генетически близки референсному штамму А/Фуцзян/411/02, проведённый в отношении них антигенный анализ с антисывороткой против А/Панама/2007/1999 показал, что они взаимодействовали с ним до гомологичного титра, из чего можно предположить, что дрейфовые изменения в молекуле НА у исследуемых нами вирусов гриппа А (H3N2) 2003-2004 гг. не хватило, чтобы они полностью или частично потеряли антигенное сродство с более ранними эталонными штаммами.

Линия вирусов подобных А/Велингтон/1/04 в ходе антигенного дрейфа в следующем сезоне (2004-2005) изменилась в сторону линии вирусов подобных А/Калифорния/7/04, что привело к пересмотру вакцинного компонента от А/Фуцзян/411/02 к А/Калифорния/7/04 (Viboud C., 2006, Daum L. et al, 2005).

Четыре замены, описанные нами, представляли линию вирусов гриппа А (H3N2), характеризующуюся с начала сезона 2004-2005. Три аминокислотные замены располагались внутри известных антигенносвязывающих сайтах, а именно замена S189N внутри сайта В и две замены V226I и S227P, которые располагались вблизи антигенного сайта D. Эти три замены сыграли определяющую роль при переходе вирусов гриппа от подобных А/Фуцзянь/411/02 к вирусам подобным А/Калифорния/7/2004 (Bragstad K. et al, 2008). Четвертая замена, найденная в российских штаммах в антигенном сайте А K145N. Учеными из Непала было показано, что эта замена связана с изменением заряда от заряженной к незаряженной аминокислотной R группе. Было

выдвинуто предположение, что поскольку замена K145N располагается внутри сайта гликозилирования, смена заряда могла повлиять на активность гликозилтрансферазы, которая приводит к изменению в гликозилировании (Daum L. et al, 2005). Важно отметить, что, несмотря на то, что изучаемы нами российские вирусы гриппа А (H3N2) молекулярно-генетически и филогенетически были близки эталонному штамму А/Калифорния/7/2004, антигенно они были близки штамму А/Кумамото/102/2002 (А/Фуцзян/411/02 — подобный вирус).

В 2005-2006 и 2006-2007 гг. в мире продолжали циркулировать вирусы подобные А/Калифорния/7/04. Однако встречались и дрейф варианты вирусов гриппа А(H3N2), которые несли характерные замены в НА S193F и D225N и L370S в последовательности НА и были подобны эталонному штамму А/Висконсин/67/05 (Suwannakarn K. et al, 2010). В результате вакцинный компонент H3N2 для северного полушария 2006-2007 был заменён на А/Висконсин/67/05. Вирусы, циркулирующие в сезоне 2005-2006 имели небольшие вариации в НА и NA по сравнению с вирусами, циркулирующими сезон ранее. У исследованных нами штаммов подобных А/Калифорния/7/2004 мы отметили замену в глобулярной части НА в позиции 226 - валин на изолейцин (V226I). Было показано, что среди изолятов вирусов гриппа А(H3N2) важную роль в связи NeuAc $\alpha$ 2,6Gal играл остаток, специфичный для вирусов гриппа H3 Pe(I)226. Опытным путем было доказано, что репликация вирусов гриппа А(H3N2) на куриных эмбрионах улучшается при наличии изменения в положении 226 (V226I), которое влияет на улучшение рецептор-связывающей способности НА (Wiwaniitkit V., 2008).

У всех изученных нами российских штаммов 2006-2007 гг. в последовательностях НА были найдены замены в позициях 193 (S193F) и 225 (D225N), которые являлись генетическими маркерами эталонного штамма А/Висконсин/67/2005, а в последовательностях М-белка встречалась замена, которую у вирусов, циркулирующих ранее мы не детектировали S31N. Известно, что замена Ser -193  $\rightarrow$  Phe (S193F) со снижением сродства вирусов к рецепторам

человека. (Nobusawa E., 2000). Также, в работе Zaraket H. (2010) было показано, что у вирусов гриппа А(Н3N2), которые циркулировали на территории Японии с 2005 по 2007 гг. была найдена замена S31N в трансмембранном домене белка М2, которая была связана с устойчивостью к амантадину и сопровождалась заменами в последовательностях HA S193F и D225N (Furuse Y., 2008). Кроме того, в связи с появлением в последовательности белка М2 значимой замены S31N, было проведено большое количество исследований по всему миру. Так в работах М. Ротанов с соавт., 2007, Бурцева Е.И. с соавт., 2009, Simonsen L. et al., 2007, Saito R. et al, 2007., Suzuki Y., 2010, было показано, что распространение штаммов резистентных к амантадину было зафиксировано в конце 2005 года. В этот период в разных странах на долю таких штаммов приходилось от 2 до 90%, однако, начиная с 2007 года, практически все детектируемые штаммы вирусов гриппа А(Н3N2) несут замену S31N в последовательностях М2 белка.

Наши результаты показали, что штаммы вируса гриппа А (Н3N2), изолированные в России с 2006 по 2008 гг. принадлежали нескольким филогенетическим кладам. В течение сезонов 2006–2007 и 2007–2008 доминировал один клад — А/Висконсин/67/2005 (WHO, 2007-008). Антигенно и филогенетически изучаемые нами штаммы с 2006 по 2008 гг. были близки А/Висконсин/67/2005. Однако в 2007–2008 гг., изолированные вирусы сменились от штаммов подобных А/Висконсин/67/2005 к штаммам подобным А/Брисбан/10/2007, (вакцинный штамм на сезон 2008 — 2009 в Северном полушарии). Эти штаммы показали более высокое значение генетического разнообразия в сравнении с вирусами гриппа А (Н3N2) изолированными на территории России в течение 2007–2008 гг. эпидемического сезона и несли характерные замены G50E в антигенном сайте С и K140I в сайте А последовательности HA; N93D, H150R и Y194I - в последовательности NA (Грудинин М.П., 2012). Два российских штамма А/Пенза/55/2008 и А/Якутия/83/2008 несли замену в последовательностях NA D151G, связанную с изменением специфичности нейраминидазы в результате взаимодействия NA вируса гриппа А(Н3N2) с рецепторами сиаловой кислоты, устойчивых к

каталитическому расщеплению. Учёные из Великобритании (Victoria Gregory, Patrick Collins et al.) показали, что вирусы с аминокислотным изменением в позиции 151 (D151G) плохо ингибировали гемагглютинацию постинфекционной антисывороткой хорька полученной против вирусов, изолированных на клетках MDCK. Наличие такой замены можно было считать приспособительным механизмом вирусов гриппа A(H3N2), однако при дальнейшем изучении последовательностей нейраминидазы данная замена больше не детектировалась.

В 2008-2009 гг. последовательности HA изучаемых нами вирусов гриппа A/H3N2 в результате антигенного дрейфа потеряли сродство с вирусми подобными A/Висконсин/67/2005. Все штаммы несли значимые генетические маркёры K173Q в антигенном сайте D в последовательностях HA и D147N и I125V в последовательностях NA, характерные для вирусов подобных вакцинному штамму A/Брисбан/10/07. Учёные из Уганды в своих исследованиях также отмечают, что в 2008-2009 гг. на территории страны, циркулировали штаммы подобные Брисбан/10/07, которые несли вышеупомянутые замены в HA и NA (Byarugaba D., 2011).

Изоляты, выделенные в мире в 2009 году эволюционировали и практически потеряли антигенное родство с вирусами, подобными эталонному штамму A/Виктория/208/09, приобретя характерные генетические маркёры N189K и K158N в антигенном сайте B (WHO, 2009-2010). Однако на территории России в 2009-2010 гг. вирусы гриппа A(H3N2), в связи с активной циркуляцией нового пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 практически не детектировались и нами изучены не были.

На территории России и в мире в течение эпидемического сезона 2010-2011 вирусные изоляты продемонстрировали как минимум 10 замен в 4 антигенных сайтах в гемагглютинине, из которых 2 мутации (E62K, N144K) в 2 антигенных сайтах являлись генетическими маркёрами нового эталонного штамма A/Перт/16/2009 (Грудинин М.П., 2012, WHO, 2010-2011). Согласно Wilson и Cox, такое событие может явиться причиной дрейфа от предыдущего штамма (Thompson W., 2004). Таким образом, референс вирус A/Перт/16/09 был

рекомендован в качестве вакцинного штамма для обоих полушарий северного и южного на 2010-2011 гг. и показывал антигенное сходство со штаммами подобными А/Виктория/208/09.

Возможное объяснение эволюции вирусов гриппа А(Н3N2), которая происходила с 2009 по 2011 гг. может быть тот факт, что вирусы гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) находятся в постоянном динамическом взаимодействии. Однако в 2009-2010 гг. почти полностью доминирующим фактором стал вирус гриппа А(Н1N)sw1, что вероятно привело к небольшому разнообразию вирусов гриппа А(Н3N2), причиной чему было необычно низкий уровень их циркуляции в природе. Генетический анализ, проведённый в нескольких странах в частности в Японии, Канаде, Франции, Северной Америке показал, что в 2010-2011 гг. детектировались вирусы гриппа А(Н3N2) подобные А/Перт/16/2009 и А/Виктория208/2009 (Eshaghi A., 2014, Wong K., 2012, Kishida N., 2012). Однако, вирусы гриппа подобные А/Перт/16/2009 в основном детектировали в начале сезона 2010-2011 (в основном в декабре), между тем как, вирусы гриппа подобные А/Виктория/208/2009 начали детектировать с января 2011 гг. В последовательностях нейраминидазы у трёх изучаемых нами российских штаммов 2010-2011 гг. приобрели важную замену (N402D), которая была связана с делецией потенциального сайта гликозилирования в позиции 402. Аналогичное изменение было найдено и у новосибирских штаммов, что позволило им принадлежать генетической группе А/Перт/16 (Sobolev I., 2012), китайских (Zhong J., 2013), канадских (Eshaghi A. et al., 2013), японских (Dapat I. et al., 2012), а также во многих других странах мира (WHO, 2010-2011).

В двух следующих эпидемических сезона (2011-2013 гг.) активное изучение штаммов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в мире и на территории России показало наличие большого количества эволюционных изменений как в антигенных областях (сайты А, В, С, D) в НА, так и по всей молекуле НА и NA, что разделило штаммы вируса гриппа на семь генетических групп, две из которых представляли клайд А/Перт/16, а остальные пять клайд А/Виктория/208/. Российские изоляты 2011-2012 гг., изучаемые нами, НИИ

гриппа (г. Санкт-Петербург) (Грудинин М.П. с соавт., 2012), как впрочем и большинство вирусов, циркулирующих в других странах (WHO, 2011-2012) относились к двум группам 3А - А/Стокгольм/18/2011 и 3С - А/Гонконг/3969/2011 и несли генетический маркер В/Виктория/208/2009 Т212А в антигенном сайте D, хотя антигенно были близки эталонному штамму А/Перт/16/2009. Так же в антигенном сайте С была найдена аминокислотная замена N278K. Есть данные что изменение в позиции 278 - N278K может вызывала конформационные изменения в молекуле HA так, что это может привести к образованию нового эпитопа, тем самым препятствуя связыванию ранее существующих антител в этом месте (Bulimo W., 2008).

В 2012-2013 году наши штаммы относились к генетической группе 3С — А/Виктория/361/11, с характерными генетическими заменам S145N в антигенном сайте А и S45N. Интересный факт, что, несмотря на аналогичные аминокислотные замены в молекулах HA и NA у всех изучаемых нами вирусов гриппа А(Н3N2), штаммы А/Томск/13/2013, А/Томск/08/2013, А/Томск/05/2013, А/Томск/04/2013 антигенно сильно отличались от эталонного штамма В/Виктория/361/2011 взаимодействуя с антисывороткой полученной к эталону от 1/16 до 1/32 гомологичного титра. Большинство штаммов, циркулирующих в мире, также относились к 3С генетической группе, однако внутри неё в связи с активными дрейфовыми изменениями в молекулах HA и NA штаммы распадались на несколько подгрупп (WHO, 2012-2013).

У российских штаммов 2011 — 2013 гг. в последовательностях гемагглютини́на и нейраминидазы мы выявили замены, которые встречались и у зарубежных штаммов (WHO, 2011-2013), связанные с приобретением потенциального сайта гликозилирования (S45N в HA и S367N&K369T в NA) и с потерей потенциального сайта гликозилирования (N144D и T128A в HA). Наличие таких замен показывает, что вирусов гриппа А (Н3N2) используют механизм, с помощью которого происходит добавление или удаление сайтов гликозилирования, что позволяет им регулировать свою антигенную изменчивость.

Таким образом, в период с 2003 по 2013 гг., эволюция вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных и изученных в ЦЭЭГ, шла в направлении А/Фуцзянь/411/2002(2003-2004) – А/Калифорния/7/04 (2005-2006) – А/Висконсин/67/2005 (2006-2007) – А/Брисбан/10/2007(2007-2008)- А/Перт/16/2009(2009-2010) - А/Виктория/208/2009(2011-2012) – А/Виктория/361/2012 (2012-2013), при этом штаммы принадлежали к разным клейдам и генетическим группам, что коррелирует с результатами, полученными другими исследователями, как в нашей стране, так и за рубежом (ВНО, 2003-2013). Вместе с тем, несмотря на высокий уровень гомологии российский изолятов, среди них были вирусы, которые несли специфические замены в последовательности НА (Т10М, Q57Н, V182I) и NA (P154S, T434N), которые не встречаются у вирусов, циркулирующих в других странах мира.

В отличие от вирусов гриппа А(Н3N2), вирусы гриппа В отмечались не такой высокой циркуляцией в изучаемый период и таким высоким молекулярно-генетическим разнообразием. Современную циркуляцию вирусов гриппа В во всём мире можно разделить на антигенные и генетические группы, представленные эталонными штаммами Ямагатской линии (В/Yamagata/16/88) или Викторианской линии (В/Victoria/2/87). С 2003 по 2013 гг. на территории Российской Федерации вирусы гриппа В Викторианской линии доминировали в 4 из 10 сезонов, трижды сменяясь на вирусы Ямагатской линии, которые преобладали в 3 сезонах, а в остальных 3 сезонах вирусы двух линий циркулировали совместно и были представлены шестью эталонными штаммами: три штамма Викторианской линии последовательно менялись от В/Гонконг/330/01 – В/Малайзия/2506/04 - В/Брисбан/60/08, три штамма Ямагатской линии менялись от В/Шанхай/361/2002 – В/Флорида/4/06- В/Висконсин/1/10.

Исследование вирусов гриппа В, изолированных на территории России показали, что по своим антигенным, филогенетическим и молекулярно-генетическим свойствам были схожи со штаммами вирусов гриппа В, циркулирующих в мире и имели в своём составе одинаковые с ними замены.

Большой интерес вызвали изученные нами штаммы- реассортанты двух эволюционных линий — Викторианской и Ямагатской - В/Москва/9/2003, В/Ярославль/14/2003, В/Хабаровск/19/2003, В/Нижний Новгород/21/2003, В/Хабаровск/57/2005, которые представляли собой реассортанты, которые принадлежали Викторианской линии, сформировав отдельную от неё ветвь и несли гемагглютинин от Викторианской линии ( НА вирусов подобных В/Гонконг/330/01), а нейраминидазу от Ямагатской линии ( НА вирусов подобных В/Сичуань/379/1999). Разные города (Москва, Ярославль, Хабаровск, Нижний Новгород), из которых были получены штаммы, указывает на тот факт, что в данный период времени реассортанты были распространены на всей территории страны.

В более ранних исследованиях других авторов (Huey-Pin Tsai et al., 2005) уже отмечалась циркуляция реассортантов вируса гриппа В. Так, например в Тайване они циркулировали на юге страны с апреля 2002 года. Их количество составляли примерно 46 % от всех вирусов гриппа В в 2002 году и они занимали доминирующее положение (73%) в период с января по апрель 2005 года. Изучение реассортантов вирусов гриппа В показали, что они явились результатом социркуляции двух эволюционных линий Ямагатской и Викторианской. Случаи реассортации встречались и ранее в течение 1990-х годов, однако тогда ген НА принадлежал Ямагатской линии, а нейраминидаза Викторианской (McCullers et al., 1999). Такие две различные генетические модели реассортации демонстрировали стратегию эволюции вирусов гриппа В в природе. Также, в 2005 году на территории Мьянмы 85% циркулирующих штаммов вирусов гриппа приходилось на реассортанты, а к 2007 году их количество достигло 100% (Dapat S., 2009)

Изучаемые нами вирусы гриппа В Ямагатской линии, полученные из Рязани, Москвы и Хабаровска в 2004-2006 гг. были подобны эталонному штамму В/Шанхай/361/2002 и несли замены K129N в петле 120, D232A и H40Y в последовательностях НА и P42T в NA. Схожие с нашими данными, молекулярно-генетическое исследование вирусов гриппа В в Тайване (Tsai H. et

al., 2005) показало наличие аналогичных замен в HA и NA.

Штаммы вирусов гриппа Викторианской линии 2005-2007 гг. (г. Якутск, Астрахань, Краснодар, Липецк, Нижний Новгород) проявляли антигенное и молекулярно-генетическое родство к эталонному штамму В/Малайзия/2506/2004. В 2005-2006 гг. в последовательностях HA российских штаммов появились значительные аминокислотные изменения: K129N в петле 120, K48E и K80R, которые привели к сменен штаммов подобных В/Малайзия/2506/2004 на В/Гонгконг/330/01- подобные штаммы (Лобова Т. Г., 2012). Эти данные коррелировали с результатами, полученными в ходе изучения наших штаммов и штаммов, изучаемых в Европейском Центра по гриппу ВОЗ (Лондон) и в Тайване (WHO, 2006-2007, Lin J., 2008). Также в последовательностях NA изученных нами изолятов были найдены замены N220K, E320D и E404K. Интересно, что присутствие этих замен у вирусов реассортантов вызвало большую эпидемию в Тайване в эпидемическом сезоне 2006-2007 (Jian J., 2008, Lin J., 2007).

В 2007-2008 гг. в частности в России, а также в странах мира на смену викторианским вирусам гриппа В пришли вирусы гриппа Ямагатской линии, представляющие собой дрейф варианты, сходные с вирусом В/Флорида/04/06 (Ivanova V.T., 2009, Gerna G., 2009) и характеризовалась заменами, которые заронули антигенно значимые области — петля 150 S150I, петля 160 — N165Y (Лобова Т. Г., 2012). Антигенный анализ исследуемых нами штаммов показал, что они плохо взаимодействовали с гомологичной сывороткой к эталону В/Флорида/04/2006 - от 1/8 до 1/32 титра. Причиной этому были значительные генетические изменения в антигенных областях (S150I, N165Y), а также G229D, которые были характерны для В/Бангладеш/3333/07 — подобных вирусов.

Хотя два штамма вируса гриппа В Викторианской линии В/Москва/5/2009 и В/Москва/6/2009 были антигенно близки эталонному штамму В/Малайзия/2506/2004 и несли характерные для него замены, по сообщению ВОЗ, а также исследования вирусов в других станах показали, что для периода с 2008 по 2009 была характерна циркуляция вирусов подобных новому эталонном

к штамму В/Брисбан/60/2008 (WHO, 2008-2009). Такие данные указывали на то, что сезон 2008-2009 характеризовался антигенным дрейфом, который привёл к тому что вирусы гриппа перестали реагировать с антисывороткой к референс штамму В/Малайзия/2506/2004, в результате чего вирусы полностью утратили своё сродство с ним. Таким образом, в следующих двух сезонах (2009-2011 гг.) молекулярно-генетический и антигенный анализы в отношении изучаемых нами штаммов показали, что они были подобны В/Брисбан/60/2008 и приобрели характерные аминокислотные замены, затрагивающие антигенные области - V146I и N165K в петле 150 и 160, соответственно в последовательностях HA и N220K и E404K в последовательностях нейраминидазы. В ходе исследования викторианских штаммов было установлено, что изменение в аминокислотной позиции 146 и 165 в HA и 220 и 404 в NA оказали значительное влияние на антигенные свойства, так, что в мире получили распространения В/Брисбан/60/08 — подобные штаммы. Так, данные маркёры были найдены в последовательностях HA и NA японских штаммов (Dapat I., 2012), а также штаммы циркулирующие в других странах Южной и Северной Америки, Европы, Средней Азии и Океании. Таким образом видно, что в период с 2009 по 2011 гг. в мире наблюдалось широкое распространение вирусов гриппа В/Викторианской линии, которые филогенетически и антигенно были близки В/Брисбан/06/2008.

Взятые в исследования штаммы В/Биробиджан/24/2012 В/Биробиджан/44/2012 и В/Владивосток/3/2012 Викторианской линии 2011-2012 гг. и В/Москва/93/2012 Ямагатской линии, подтвердили, что на территории России в этот период наблюдалась совместная циркуляция двух эволюционных линий, как и в других странах Европы (Sominina A. et al., 2013, Лобова Т. Г., 2012, WHO, 2011-2012). Викторианские штаммы по антигенным и молекулярно-генетическим свойствам были подобны вакцинному штамму В/Брисбан/60/08, в то время как ямагатские штаммы приобрели аминокислотную замену в антигенной области 190- спирали — N202S и филогенетически были подобны эталону В/Висконсин/1/10. Однако, эта замена существенного влияния на

антигенные свойства вирусов гриппа В/Ямагатской линии не оказала, так что они остались антигенно близки вирусу В/Бангладеш/3333/2007 (Sominina A. et al., 2013).

Вирусы гриппа В двух эволюционных линий продолжали социркулировать и в эпидемическом сезоне 2012-2013. Изучаемы нами вирусы гриппа Викторианской линии антигенно показали сродство к эталонному штамму В/Висконсин/1/10, однако штамм В/Москва/2/2013 плохо реагировал с антисывороткой к данному эталону. Проведённые в отношении него молекулярно-генетический анализ не выявил никаких дополнительных замен в последовательностях НА и NA в сравнении с другими российскими изолятами. Интересный факт и в отношении ямагатских штаммов — В/Нижний Новгород/28/2013 и В/Москва/3/2013 плохо прореагировали с антисывороткой против В/Висконсин/1/10 — от 1/16 до 1/32 гомологичного титра. Однако филогенетически они были близки эталону, кроме того, проведённый в отношении их молекулярно-генетический анализ показал, что последовательности НА и NA были схожи с последовательностями других российских штаммов подобных В/Висконсин/1/10. Можно предположить, что такой факт, указывает на то, что антигенные свойства не всегда могут зависеть от молекулярно-генетического строения штаммов вирусов гриппа. Часть исследуемых нами штаммов В/Ямагатской линии, полученные из Томска и Москвы филогенетически были близки новому эталону В/Массачусетс/02/2012 и приобрела характерные для него замены в последовательностях НА - T181A и NA — R65H, при этом некоторые из них реагировали с антисывороткой против В/Висконсин/1/10 от 1/4 до 1/8 гомологичного титра, что указывало на их антигенное сродство с данным эталоном. Наши данные коррелируют с данными мировых исследований. Так, согласно сообщениям ВОЗ штаммы вируса гриппа В В/Ямагатской линии принадлежали двум клэйдам - первый клэйд был представлен новым штаммом, рекомендованным в состав гриппозной вакцины на сезон 2013-2014 В/Массачусетс/02/12, второй клэйд нёс В/Висконсин/1/10 — подобные вирусы. Среди вирусов, принадлежащих клэйду 2 встречались

штаммы, которые плохо реагировали с антисывороткой против эталона В/Висконсин/1/10, однако причиной были заметные дрейфовые изменения в молекуле гемагглютинин, которые также затронули антигенную область 120 петлю Q122K (WHO, 2012-2013).

Исследуемые нами российских штаммы вирусов гриппа В 2011 — 2013 гг. несли замены в последовательностях нейраминидазы- А465Т и D463N, связанные с приобретением сайта гликозилирования и N197S в гемагглютинине, связанную с утратой потенциального сайта гликозилирования. Такие эволюционные изменения у штаммов вируса гриппа В указывает на их общий механизм с вирусами гриппа А, с помощью которого происходит добавление или удаление сайтов гликозилирования, что позволяет вирусам регулировать свою антигенную изменчивость.

Таким образом, в период с 2003 по 2013 гг. антигенные и молекулярно-генетические свойства изучаемых нами вирусов гриппа В В/Ямагатской линии менялись в направлении В/Цзянсу/10/03- В/Флорида/4/06-В/Бангладеш/3333/07- В/Висконсин/1/10, а у вирусов гриппа В В/Викторианской линии в направлении В/Гонконг/330/01- В/Малайзия/2506/2004-В/Брисбан/60/08, что коррелировало с данными, полученными как российских, так и зарубежных исследователей.

Эволюционные изменения, которые происходили за счёт постоянных дрейфовых изменения в молекулах гемагглютинина и нейраминидазы, были найдены, как в антигенных областях НА (петля 120, петля 150, петля 160 и спираль 190), так и затронули всю молекулу НА и НА и совпадали с изменениями, зафиксированными в штаммах, циркулировавших по всему миру и влияли на антигенные свойства вирусов, что приводило к смене вакцинных штаммов.

Кроме того, успешное выживание возбудителей вирусов гриппа В происходило за счёт чередования представителей двух эволюционных линий, причем за последние десять лет в России наблюдается более частая смена викторианских и ямагатских штаммов — примерно каждые 2-3 года (Лобова Т. Г., 2012). Такая эволюционная изменчивость современных вирусов гриппа В-

чередование антигенно и генетически различных групп , создаёт трудности при прогнозировании этого компонента в составе сезонных гриппозных вакцин (Anga L., 2013).

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что доленое участие вирусов гриппа А(Н3N2) и В в эпидемическом процессе с 2009 года изменилось с появлением и активным распространением пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm09: штаммы вируса гриппа А(Н3N2) в 2009-2010 гг. были не активны, а с 2010 по 2013 гг. социркулировали с вирусами гриппа В и А(Н1N1)pdm09. В популяции вируса гриппа В отмечена активность представителей обеих эволюционных линий с доминированием штаммов, подобных В/Виктория – подобных в 2009-2012г., исключение составил сезон 2012-2013гг.
2. Установлено, что все исследованные штаммы вируса гриппа А(Н3N2) в период с 2003 по 2013 гг. по своим антигенным свойствам и принадлежности к генетическим клэйдам и группам соответствовали рекомендациям ВОЗ по составу гриппозных вакцин.
3. Молекулярно-генетический анализ показал, что эволюционная изменчивость вируса гриппа А(Н3N2) сопровождалась последовательной сменой антигенных клэйдов, что было связано с аминокислотными заменами в HA и NA, которые повлияли на антигенные свойства штаммов. Определены специфические замены в HA (T10M, Q57H, V182I) и NA (P154S, T434N) российских штаммов, которые не встречались у штаммов, циркулировавших в других странах мира.
4. В NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2) изменения не привели к формированию резистентности к антинейраминидазным препаратам. В последовательностях M2-белка штаммов вируса гриппа А(Н3N2) сохраняется замена S31N, связанная с резистентностью к адамантанам (амантадину и ремантадину).

5. Было установлено, что исследуемые штаммы вируса гриппа В двух эволюционных линий, как по своим антигенным свойствам, так и по принадлежности к генетическим клейдам и группам соответствовали рекомендациям ВОЗ по составу гриппозных вакцин в соответствующие годы.
6. Показано, что штаммы вируса гриппа В эволюционировали двумя линиями- В/Виктория-подобные и В/Ямагата-подобные, изменения в которых были связаны с аминокислотными заменами, во всех антигенных областях (петля 120, петля 150, петля 160 и спираль 190). Наибольшее количество аминокислотных изменений было выявлено в петле 120, которую относят к наиболее изменчивой области.
7. Все штаммы вируса гриппа В сохранили чувствительность к препаратам с антинейраминидазной активностью.
8. Установлено, что лабораторный вариант тест-системы на основе ПЦР в реальном времени с использованием двух зондов (IBNYpr и IBHVpr), меченных красителями FAM и HEX, является специфичным и пригодным для детекции и дифференциации эволюционных линий вируса гриппа В и может быть использован для мониторинга в лабораторных условиях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Г.И., Закстельская Л.Я., Злыдников Д.М. и др. Грипп // В кн.: Советская энциклопедия: Москва: 100-115. (1989).
2. Бурцева Е.И., Шевченко Е.С., Белякова Н.В и др., Мониторинг чувствительности выделенных в России эпидемических штаммов вирусов гриппа к этиотропным химиопрепаратам.// Вопр. вирусолог.5: 19-24 (2009).
3. Бреслав Н. В., Шевченко Е. С., Абрамов Д. Д. и др., Эффективность применения антинейраминидазных химиопрепаратов во время пандемии гриппа и в постпандемический период. // Вопр. вирусолог.1: 28-32 (2013).

4. Грудинин М.П., Комиссаров А.Б., Писарева М.М. и др., Генетическое разнообразие и молекулярная эволюция вирусов гриппа А в России в 2006-2012 гг.// Вопр. вирусолог. 6: 37-42 (2012).
5. Ю.З. Гендон Анализ активности гриппа в эпидемический сезон 2003/2004 гг.// Грипп 3(33): 5-8 (2004).
6. Жданов В.М., Петров Н.А., Самохвалов Е.И. и др., Структурные перестройки в гемагглютинине вируса гриппа при пересечении межвидового барьера.//В кн.: Доклады академии наук СССР. М:1002-1005 (1986).
7. Иванова А.В. Сравнительный анализ вирусов гриппа викторианской линии по антигенным и биологическим свойствам. // Тезисы докладов участников VII Всероссийской конференции молодых исследователей. СПб: 102 -103 (2004).
8. Иванова В.Т., Трушакова С.В., Оскерко Т.В. и др., Характеристика циркулировавших в России в сезоне 2007-2008 гг. эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В Вопр. вирусолог. 1: 24-28 (2006).
9. Каверин Н.В. Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Антигенная структура гемагглютинина вируса гриппа А.// Вопросы статья прил. 1: 148-158 (2012).
10. Киселев О.И., Соминина А.А., Смородинцева Е.А., Сравнительная этиологическая характеристика эпидемии гриппа 2010-2011 гг. в Российской Федерации.// Вакцинация 1:7-10 (2011).
11. Коновалова Н. И., Еропкин М. Ю., Гудкова Т. М. и др., Этиологическая характеристика эпидемических вирусов гриппа 2006-2009 гг.// Вопросы вирусологии 4 (2010).
12. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Исакова И.Н. и др. Фенотипические особенности эпидемических штаммов вируса гриппа типа В, выделенных в разные годы // Вопр. вирусолог. 5: 38 – 41 (2006).
13. Литвинова О.М., Смородинцева Е.А., Деева Э.Г. и др. Этиология современного гриппа. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика 1: 5-9 (2001).

14. Лобова Т.Г., Прокопец А.В., Комиссаров А.Б. и др., Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. // Вопр. вирусолог. 6: 22-26 (2012).
15. Львов Д.К. Бурцева Е. И. Колобухина Л.В. и др., Развитие эпидемии гриппа в сезоне 2011-2012 гг. на отдельных территориях России. Итоги деятельности Центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России. // Вопр. вирусолог. 2: 10-15 (2013).
16. Методические указания к работе опорных баз Всесоюзного центра по гриппу и ОРЗ, Л.: 40-42.
17. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. // Методические указания МУ 3.3.2.1758-03. М., (2005).
18. Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации
19. Об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ 2004-2005 гг. и прогнозе на эпидсезон 2005-2006 гг. прав потребителей и благополучия человека. // Письмо (2005).
20. Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Об итогах эпидсезона по гриппу и ОРВИ 2005-2006 гг. и прогнозе на эпидсезон 2006-2007 гг. прав потребителей и благополучия человека. // Письмо (2006).
21. Перетрухина А.Т. , Блинова Е.И., Препараты, применяемые против гриппа // в кн. Бактерийные и вирусные препараты: Академия Естествознания: 2568-2579 (2010).
22. Слепушкин А.Н. Бурцева Е.И. Щелканов М.Ю. и др. Характеристика штаммов вируса гриппа А(Н3N2) в эпидемическом сезоне 2003—2004 гг в России. // Вопр. вирусолог. 1: 19-23 (2006).
23. Смородинцев А.А. Грипп и его профилактика. // Руководство для врачей Л: Медицина: 356-358 (1984).

24. Штыря Ю.А. , Мочалова Л.В. , Бовин Н.В. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функции.// *Acta Naturae* 2: 10-15 (2009).
25. Anga L., Faouzi A., Benabbes L., Molecular characterization of influenza B circulating in casablanca-morocco during 2010-2013.// *International Journal of Development Research* 4: 467-473 (2014).
26. Ann J., Papenburg J., Bouhy X., Molecular and antigenic evolution of human influenza A/H3N2 viruses in Quebec. // *J Clin Virol.* 53:88-92 (2012).
27. Baek Y., Park, J.; Song Y. et al. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of H3N2 Human Influenza A Viruses in Cheongju, South Korea.// *The journal of microbiology* 47: 91-100 (2009).
28. Barr I.G., McCauley J., Cox N., Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season.// *Vaccine* 28: 1156–1167 (2010).
29. Barr I. G., Komadina N., Hurt A. et al., Reassortants in recent human influenza A and B isolates from South East Asia and Oceania.// *Virus Res.* 98: 35-44 (2003).
30. Baudin F, Petit I, Weissenhorn W, Ruigrok RW: In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein.// *Virology* 281: 102-108 (2001).
31. Berton M. T., Naeve C. W., Webster R. G., Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies.// *J. Virol.* 52: 919-927 (1984).
32. Bonabeau E, Toubiana L, Flahault A. The geographical spread of influenza.// *Proc Biol Sci* 265: 2421–2425 (1998).
33. Boni T., Cobey S., Beerli P., et al., Epidemic dynamics and antigenic evolution in a single season of influenza A.// *Proc Biol Sci.* 273: 1307-1316 (2006).
34. Bossart P.J., Babu Y.S., Cook W.J. et al., Crystallization and preliminary X-ray analyses of two neuraminidases from influenza B virus strains B/Hong Kong/8/73 and B/Lee/40.// *J Biol Chem.* 263(13): 6421–6423 (1988).

35. Bossart-Whitaker P., Carson M., Babu Y.S. et al., Threedimensional structure of influenza A N9 neuraminidase and its complex with the inhibitor 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl neuraminic acid. // *J. Mol. Biol.* 232: 1069–1083 (1993).
36. Bouvier N. M., Palese P. The biology of influenza viruses. // *Vaccine* 26: 49-53 (2008).
37. Bragstad K., Emborg H.D., Fischer T. K., Low vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) virus among elderly people in Denmark in 2012/13 – a rapid epidemiological and virological assessment. // *Eurosurveillance*, 18: 1-5 (2013).
38. Bragstad K. Nielsen L. P. Fomsgaard A., The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: A complete genome study 2008. // *Virology Journal* 5: 40-48 (2008).
39. Bright, RA, Medina, MJ, Xu, X et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. // *Lancet* 366:1175-1181 (2005).
40. Bulimo W.D., Garner J.L., Schnabel D.C. et al., Genetic analysis of H3N2 influenza A viruses isolated in 2006-2007 in Nairobi, Kenya. // *Influenza Other Respir Viruses*. 2(3):107-113 (2008).
41. Burmeister W. P., Ruigrok R. W., Cusack S., The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. // *J. EMBO* 11(1): 49–56 (1992).
42. Burmeister W.P., Daniels R.S., Dayan S. et al., Sequence and crystallization of influenza virus B/Beijing/1/87 neuraminidase. *Virology*. 180(1): 266–272. (1991).
43. Burnham A. J., Baranovich T., Marathe B. M et al., Fitness Costs for Influenza B Viruses Carrying Neuraminidase Inhibitor-Resistant Substitutions: Underscoring the Importance of E119A and H274Y. // *Antimicrob Agents Chemother.* (2014).
44. Bush R.M., Fitch W.M., Bender C.A. et al., Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. // *Mol Biol Evol* 16: 1457–1465 (1999).
45. Byarugaba D. Erima B. Millard M. et al., Genetic analysis of influenza B viruses isolated in Uganda during the 2009-2010 seasons . // *Virol J.* 10: 11-15 (2013)

46. Byarugaba D. K., Mariette F., Erima D. B. Molecular Epidemiology of Influenza A/H3N2 Viruses Circulating in Uganda. // *Influenza Other Respir Viruses*. 8(2): 250-257 (2014).
47. Cady S.D. et al. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. // *Nature*. 463(7281): 689–692 (2010).
48. Caton, A. J., G. G. Brownlee, J. W. Yewdell, and W. Gerhard., The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). // *Cell* 31: 417-427 (1982).
49. CDC. Influenza Type A Viruses and Subtypes. // <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm> (2013).
50. Chen R., Holmes E., The Evolutionary Dynamics of Human Influenza B Virus. // *J Mol Evol* 66: 655–663 (2008).
51. Chen Z., Zhou H., Jin H., The impact of key amino acid substitutions in the hemagglutinin of influenza A (H3N2) viruses on vaccine production and antibody response. // *Vaccine* 28:4079–4085 (2010).
52. Chi S.X., Bolar T.V., Zhao P., et al.: Evolution of Human Influenza A/H3N2 Virus in Asia and Europe from 2001 to 2003. // *Journal of Clinical Microbiology* 43: 6130-6132 (2005).
53. Clancy S., Genetics of the influenza virus. // *Nature Educatio* 1(1): 83(2008).
54. Clyde D. Suzuki Y. Kon M., Phylogenetic Analysis of an Off-Seasonal Influenza Virus A (H3N2) in Niigata. // *Jpn J Infect Dis* 64: 237-241 (2011).
55. Coleman M. T., Dowdle W. R., Pereira H. G. The Hong Kong/68 Influenza A2 Variant. // *The Lancet* 292: 1384–1386 (1968).
56. CDC Prevention and Control of Influenza. // *MMWR* 55: 44-46 (2006).
57. Colman P.M. NA enzyme and antigen. // *The influenza viruses*. New York: Plenum Publishing Corporation: 175–218. (1989).
58. Colman P.M., Varghese J.N., Laver W.G., Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. // *Nature*. 303(5912): 41–44 (1983).
59. Das S.R., et al. Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as

- an immune evasion strategy.// *Proc Natl Acad Sci* 108(51): 1417–1422 (2011).
60. Dapat I.C., Dapat C., Baranovich T., Genetic Characterization of Human Influenza Viruses in the Pandemic (2009–2010) and Post-Pandemic (2010–2011) Periods in Japan.// *Plos One* 7(6): 1-12 (2012)
61. Dapat C., Suzuki Y., Saito R. et al. Rare influenza A(H3N2) variants with reduced sensitivity to antiviral drugs.// *Emerg Infect Dis* 16 (3): 493–496 (2010).
62. Davies H.W., Appleyard G., Cunnighan P. et al., The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus. // *Bull. WHO* 56: 1991-1993 (1978).
63. Daum L., Influenza A (H3N2) Outbreak, Nepal. // *Emerging Infectious Diseases* 11: 210-215 (2005).
64. De Clercq E. Chen R., Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov.* 5(12): 1015–1025 (2006).
65. Eshaghi A., Duvvuri V.R., Li A. et al, Genetic characterization of seasonal influenza A (H3N2) viruses in Ontario during 2010–2011 influenza season: high prevalence of mutations at antigenic sites. // *Influenza Other Respir Viruses.* 8: 250-257 (2014).
66. Fitch W.M., Leiter J.M., Li X. et al, Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses.// *Proc Natl Acad Sci* 88: 4270–4272 (1991).
67. Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., et al., Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls".// *J. Virol.* 79 (5): 2814–2822 (2005).
68. Furuse Y., Suzuki A., Kamigaki T., Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis.// *Virology Journal* 6: 67-78 (2009).
69. Garcha-Sastre A., The neuraminidase of bat influenza viruses is not a neuraminidase.  
[//http://www.pnas.org/content/early/2012/10/24/1215857109.full.pdf](http://www.pnas.org/content/early/2012/10/24/1215857109.full.pdf)
70. Garman E., Laver G., Controlling influenza by inhibiting the virus's neuraminidase.// *Curr Drug Targets.*:5(2):119-36 (2004).

71. Garman E., Laver G. The Structure, Function, and Inhibition of Influenza Virus Neuraminidase.// *Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design*
72. *Protein Reviews* (1): 247-267 (2005).
73. Galiano M., Johnson B. F., Myers R., Fatal Cases of Influenza A(H3N2) in Children: Insights from Whole Genome Sequence Analysis.// *Plos One* 10: 15-22 (2012).
74. Gao Q, Brydon EWA, Palese P. "A Seven-segmented Influenza A Virus Expressing the Influenza C Virus Glycoprotein HEF"// *Journal of Virology*. 82(13):6419-6426 (2008).
75. Guo Y., Jin F., Wang P., Wang M., Zhu J.M. (1983). "Isolation of Influenza C Virus from Pigs and Experimental Infection of Pigs with Influenza C Virus.// *Journal of General Virology* 64: 177–82.
76. Gerhard W, Mozdzanowska K, Furchner M, et al., Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection. // *Immunological Reviews* 159: 95-103 (1997).
77. Ghedin E., Sengamalay N. A., Shumway M., Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution.// *Nature* 437, 1162-1166 (2005).
78. Gymez-Puertas P., Carmen Albo, [...], and Agustín Portela Influenza Virus Matrix Protein Is the Major Driving Force in Virus Budding.// *J Virol*.74(24): 11538–11547 (2000).
79. Grambas S., Bennett M.S., Hay A.J., Influence of amantadine resistance mutations on the pH regulatory function of the M2 protein of influenza A viruses.// *J Virol*. Apr; 80(7): 3675–3678. (2006).
80. Grais RF, Ellis JH, Glass GE Assessing the impact of airline travel on the geographic spread of pandemic influenza.// *Eur J Epidemiol* 19: 1065–1072 (2003).
81. Gutierrez-Pizarraya A., Perez-Romero P., Alvarez R. et al., Unexpected severity of cases of influenza B infection in patients that required hospitalization during the first postpandemic wave.// *J Infect*.65: 423–430 (2012).

82. Gubareva L. V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. // *Virus Res.* 103: 199-203 (2004).
83. Hay, A; Gregory V, Douglas A. et al., The evolution of human influenza viruses. // *Biol Sci.* 356(1416): 1861-1870 (2001).
84. Hampson A. W., Influenza virus antigens and antigenic drift". // *Influenza. Elsevier Science:* 49–86 (2002).
85. Harris A., Forouhar F. Qiu S., The Crystal Structure of the Influenza Matrix Protein M1 at Neutral pH: M1–M1 Protein Interfaces Can Rotate in the Oligomeric Structures of M1. // *Virology* 289: 34-44 (2001).
86. Hensley SE, et al. Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A. // *Science.* 326(5953): 734-736 (2009).
87. Holmes E., Ghedin E., Miller N., Whole-Genome Analysis of Human Influenza A Virus Reveals Multiple Persistent Lineages and Reassortment among Recent H3N2 Viruses. // *PLoS Biol.* 3: 2-15 (2005).
88. Huang J., Jinn-Moon Yang Changed epitopes drive the antigenic drift for influenza A (H3N2) viruses. // *BMC Bioinformatics* 12: 31-45 (2011).
89. Igarashi M, Ito K, Kida H. et al., Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. // *Virology* 376(2): 323-329. (2008)
90. Ikonen N., Pyhälä R., Axelin T., Reappearance of influenza B/Victoria/2/87-lineage viruses: epidemic activity, genetic diversity and vaccination efficacy in the Finnish Defence Forces. // *Epidemiol Infect.*; 133(2): 263-71. (2005)
91. Ina Y., Gojobori N. Statistical analysis of nucleotide sequences of the hemagglutinin gene of human influenza A viruses. // *Proc Natl Acad Sci* 91: 8388–8392 (1994).
92. Isaeva E.I., Ivanova V.T., Rovnova Z.I. et al., The mapping of the hemagglutinin sites of the influenza viruses H3N2 isolated in 1990-1993 // *Vopr Virusol.* 1994 Mar-Apr; 39(2): 62-5.

93. Isalde C, Dapat C., Baranovich T. et al, Genetic Characterization of Human Influenza Viruses in the Pandemic (2009–2010) and Post-Pandemic (2010–2011) Periods in Japan. // *Plos One* 7: 1-12 (2012).
94. Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. // *J Gen Virol.* 92: 1–17 (2011).
95. Jian J.W., Lai C.T., Kuo C.Y., et al: Genetic analysis and evaluation of the reassortment of influenza B viruses isolated in Taiwan during the 2004–2006 and 2006–2007 epidemics. // *Virus Res* 131: 243–249 (2008).
96. Jiyeon Lee Young, Jun Song Jeung, Hyun Park Emergence of Amantadine-Resistant H3N2 Avian Influenza A Virus in South Korea. // *J Clin Microbiol.* Nov; 46(11): 3788–3790 (2008).
97. Jones L.D., Non-viraemic transmission of Thogoto virus: influence of time and distance. // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 83(5): 712-714 (1989).
98. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. // *Biopolymers.* 22(12): 2577–2637 (1983).
99. Karen K. Wong, Adena Greenbaum, Maria E. et al., Outbreak of Influenza A (H3N2) Variant Virus Infection among Attendees of an Agricultural Fair, Pennsylvania, USA, 2011. // *Emerg Infect Dis.* 18(12):1937-1944 (2012)
100. Kinnunen L., Ikonen N., Piiry T. et al., Evolution of influenza B/Victoria/2/87-like viruses: occurrence of a genetically conserved virus under conditions of low epidemic activity. // *Journal of General Virology* 73: 733-736 (1992).
101. Kishida N., Fujisaki S., Yokoyama M. Evaluation of Influenza Virus A/H3N2 and B Vaccines on the Basis of Cross-Reactivity of Postvaccination Human Serum Antibodies against Influenza Viruses A/H3N2 and B Isolated in MDCK Cells and Embryonated Hen Eggs. // *Clin Vaccine Immunol.* 19(6): 897-908. (2012).
102. Kossyvakis A., Kalliaropoulos A., Pogka V., Genetic and antigenic variation of seasonal A/H3N2 influenza viruses isolated in Southern Greece during the winter period of 2011-2012. // [file:///C:/Users/User/Downloads/P2440%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/P2440%20(2).pdf) (2012).

103. Krumbholz A., Schmidtke M., Bergmann S. et al., High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses.// *J Gen Virol.* 90: 900-908 (2009).
104. Kumar S., Nei M., Dudley J. et al., MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences.// *Brief Bioinform* 9: 299–306 (2008).
105. Lamb RA, Lai CJ, Choppin P.W., Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins.// *Proc Natl Acad Sci* 78: 4170–4174 (1981).
106. Lamb R.A., Zebedee S.L., Richardson C.D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface.// *Cell*, 40:627-633 (1985).
107. Laplante J., Babady E., Clement E. et al., Influenza neuraminidase mutations in A/H3N2 viruses during the 2011-2012 and 2012-2013 seasons.// 29<sup>th</sup> Clinical Virology Symposium Poster (2013).
108. Laver W.G. Crystallisation and peptide maps of neuraminidase heads from H2N2 and H3N2 influenza virus strains. // *Virology* 86, 87-98 (1978).
109. Laver, G., Garman, E.. The origin and control of pandemic influenza.// *Science*, 293: 1776-1777 (2001).
110. Laver W.G., Webster R.G. Selection of antigenic mutants of influenzaviruses. Isolation and peptide mapping of their hemagglutination proteins.// *Virology* 34: 193–202 (1968).
111. Lin J.H., Chiu SC, Shaw MW, et al: Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004–2005 season in Taiwan.// *Virus Res* 124: 204–211 (2007).
112. Li Y Bostick D L. Sullivan C B. et al., Single Hemagglutinin Mutations That Alter both Antigenicity and Receptor Binding Avidity Influence Influenza Virus Antigenic Clustering. // *J Virol.*, 87: 9904–9910. (2013).
113. Lin J.H., Chiu S.C., Cheng J.C. et al., Molecular epidemiology and antigenic analyses of influenza A viruses H3N2 in Taiwan.// *Vaccine*: 28:1156-1167 (2010).

114. Lin Y., Gregory V., Collins P., Neuraminidase Receptor Binding Variants of Human Influenza A(H3N2) Viruses Resulting from Substitution of Aspartic Acid 151 in the Catalytic Site: a Role in Virus Attachment?// *J. Virol.* 84: 6769-6781 (2010).
115. Lin Y.P, Gregory V, Bennett M. et al., Recent changes among human influenza viruses.// *Virus Res.* 103(1-2): 47-52 (2004).
116. Lina Y. P., Xionga X., Whartona S. A. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin.//*Proc.Natl Acad Sci* 109 (52):1023-1029 (2012).
117. Lindstrom S.E., Hiromoto Y., Nishimura H. et al., "Comparative Analysis of Evolutionary Mechanisms of the Hemagglutinin and Three Internal Protein Genes of Influenza B Virus: Multiple Cocirculating Lineages and Frequent Reassortment of the NP, M, and NS Genes".// *J. Virol.* 73 (5): 4413–4426 (1999).
118. Longini I.M., Fine P.E., Thacker S.B. Predicting the global spread of new infectious agents.// *Am J Epidemiol* 123: 383–391 (1986).
119. Lu B., Zhou H., Chan W. et al., Single amino acid substitutions in the hemagglutinin of influenza A/Singapore/21/04 (H3N2) increase virus growth in embryonated chicken eggs.// *Vaccine* 24 (44–46): 6691–6693 (2006).
120. Markussen T., Sindre H., Jonassen C.M. et al., Ultra-Deep Pyrosequencing of Partial Surface Protein Genes from Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV) Suggest Novel Mechanisms Involved in Transition to VirulenceArticle information.// *PLoS One.* 8(11): 1-15 (2013).
121. Martin, J., S. A. Wharton, Y. P. Lin., et al., Studies of the binding properties of influenza hemagglutinin receptor-site mutants. // *Virology* 241:101-111 (1998).
122. Matrosovich M. N., Matrosovich T. Y., Klenk H. et al., Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium.// *J Virol.* 78(22): 12665–12667 (2004).
123. Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J. et al., Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors.// *J Virol.* 77(15): 8418–8425 (2003).

124. Matsuzaki Y, Sugawara K, Takashita E, et al. Genetic diversity of influenza B virus: the frequent reassortment and cocirculation of the genetically distinct reassortant viruses in a community". *J. Med. Virol.* 74 (1): 132–140 (2004).
125. Medeiros R, Escriou N, Naffakh N et. al., Hemagglutinin residues of recent human A(H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes.// *Virology* 289(1): 74–85(2001).
126. Mishin V.P., Sleeman K., Levine M. The effect of the MDCK cell selected neuraminidase D151G.// *Antiviral Res.* 101: 93-96. (2014).
127. McKimm-Breschkin J., Trivedi T., Hampson A., Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to Zanamivir and Oseltamivir. *Antimicrobiol. //Agents and Chemotherapy* 47: 2264-2272 (2003).
128. McCullers J.A., Wang G.C., He S. et al., Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. // *J Virol.* 73: 7374–7348 (1999).
129. McCullers J.A., Saito T., Iverson A.R., Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003.// *J Virol.*78: 12817–12828. (2004).
130. McKimm-Breschkin J. L, Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance.// *Influenza Other Respir Viruses.* 1: 25-36. (2013).
131. Murphy B. R., Kasel J. A., Chanock R. M., Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man.// *N. Engl. J. Med.* 286: 1329-1332 (1972).
132. Muyanga J., Matsuzaki Y., Sugawara K. et al., Antigenic and genetic analyses of influenza B viruses isolated in Lusaka, Zambia in 1999.// *Arch. Virol.*146: 1667-1679 (2001).
133. Nakagawa N., Kubota R., Nakagawa T., Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the 'loop'.// *J. Gen. Virol.* 84: 769-773 (2003).
134. Nakagawa N., Kubota R., Okuno Y., Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus Victoria group isolates in Japan.// *J. Clin. Microbiol.* 43: 4212-4214 (2005).

135. Nakagawa N., Kubota R., Maeda A. et al., Heterogeneity of influenza B virus strains in one epidemic season differentiated by monoclonal antibodies and nucleotide sequences.// *J. Clin. Microbiol.* 38: 3467-3469 (2000).
136. Nakagawa N., Kubota R., Nakagawa T. et al., Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains.// *J. Gen. Virol.* 82: 2169-2172 (2001).
137. Nakagawa N., Kubota R., Maeda A. et al., Influenza B virus Victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season.// *J. Clin. Microbiol.* 42: 3295-3297 (2004).
138. Nelson M., Simonsen L., Holmes E., The origin and global emergence of adamantane resistant A/H3N2 influenza viruses // *J Gen Virol.* 388: 270-278 (2009).
139. Nerome, R., Y. Hiromoto, S. Sugita, N. Tanabe, M. Ishida, M. Matsumoto, S. E. Lindstrom, T. Takahashi, and K. Nerome. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism.// *Arch. Virol.* 143:1569-1583 (1998).
140. Nguyen H.T., Fry A.M., Gubareva L.V., Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods.// *Antivir. Ther.* 17: 159 – 173 (2012).
141. Ni F., Kondrashkina E., Wang Q., Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin.// *Virology*: 446(1-2):112-122 (2013).
142. Nicholls H. Pandemic influenza : the inside story.// *PLoS boil. J.* 4: 0156 – 0160 (2006).
143. Nelson M. I., Holmes E. C. The evolution of epidemic influenza. // *Nat.Rev. J.*: 8(3): 196-205 (2007).
144. Nicholson, KG et al. Origin of influenza pandemic. // *Influenza. Lancet* , 362:1733-1745(2003).
145. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. Textbook of Influenza.// Blackwell Science. (1998).

146. Nobusawa E., Ishihara H., Morishita T., et al. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): A single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. // *Virology*: 278(2): 587–596 (2000).
147. Nobusawa E., Sato K., Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. // *J Virol*. 80: 3675–3678 (2006).
148. Oh D.Y. Barr I.G., Mosse J.A., MDCK-SIAT1 Cells Show Improved Isolation Rates for Recent Human Influenza Viruses Compared to Conventional MDCK Cells. // *J Clin Microbiol*. 46(7):2189-2194 (2008)
149. Pielaka R.M., Schnellc J.R., Choua J.J., Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. // *Pnas* 106 (18): 7379 –7384 (2009).
150. Puzelli, S., Frezza F., Fabiani C. et. al., Changes in the hemagglutinins and neuraminidases of human influenza B viruses isolated in Italy during the 2001-02, 2002-03, and 2003-04 seasons. // *J. Med. Virol*. 74:629-640 (2004).
151. Pariani E. Amendola A. Ebranati E. Genetic drift influenza A(H3N2) virus hemagglutinin (HA) variants originated during the last pandemic turn out to be predominant in the 2011–2012 season in Northern Italy. // *Infect Genet Evol*. 13: 252-260
152. Portela A and Digard P. “The Influenza Virus Nucleoprotein: A Multifunctional RNA-binding Protein Pivotal to Virus Replication. // *Journal of General Virology*. 83(4):723-734.
153. Rick. A., Bright D.K., Shay B.S., et all. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. // *JAMA*. 295: 891-894 (2006).
154. Robertson, J. S., Bootman J. S., Nicolson C. et al., The hemagglutinin of influenza B virus present in clinical material is a single species identical to that of mammalian cell-grown virus. // *Virology* 17: 935-940 (1990).
155. Rogers G.N., et al. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. // *Nature*.304(5921): 76–78 (1983).

156. Rota P.A., Hemhill M.L., Whistler T., Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent cocirculating strains of influenza B virus.// *J Gen Virol.* 73: 2737–2742 (1992).
157. Ruiz-Carrascoso G., Casas I., Pozo F. et al., Prolonged shedding of amantadine- and oseltamivir-resistant influenza A(H3N2) virus with dual mutations in an immunocompromised infant.// *Antivir Ther.* 15: 1059-1063 (2010).
158. Russell C ., Jones T.C., Barr I. G., The Global Circulation of Seasonal Influenza A (H3N2) Viruses.// *Science* 320 (5874): 340 (2008).
159. Rvachev L.A., Computer modeling experiment on large-scale epidemic. *Dokl USSR.*// *Acad Sci* 2: 294–296 (1968).
160. Saito R., Li D., Suzuki H. et al., Amantadine-Resistant Influenza A (H3N2) Virus in Japan, 2005–2006.// *N Engl J Med* 356:312-313 (2007).
161. Schmidtke M, et al. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001.// *Intervirology.* 49(5): 286–293 (2006).
162. Sha B, Luo M., Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1.// *Nat. Struct. Biol.* 4 (3): 239–44 (1997)
163. Simonsen L ., Viboud C., Grenfell B. T., The Genesis and Spread of Reassortment Human Influenza A/H3N2 Viruses Conferring Adamantane Resistance.// *Mol Biol Evol.* 24(8):1811-1820 (2007).
164. Sleight M.J., Both G.W., Underwood P.A. et al., Antigenic drift in the hemagglutinin of the Hong Kong influenza subtype: correlation of amino acid changes with alterations in viral antigenicity.// *J Virol* 37: 845–853 (1981).
165. Slepishkin V.A., Staber P.D., Wang G., Infection of human airway epithelia with H1N1, H2N2, and H3N2 influenza A virus strains. // *Mol Ther.* 3: 395-402 (2001).

166. Smith G.J., Vijaykrishna D., Bahl J. et al., Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic.// *Nature*. 459(7250): 1122-1125 (2009).
167. Soboleva I., Kurskaya O., Susloparova I., Molecular genetic analysis of influenzaA/H3N2 virus strains isolated in Western Siberia in the 2010–2011 epidemic season. // *Infect Genet Evol*. 12: 1694-1698 (2012).
168. Sominina A., Burtseva E., Eropkin M. et al ,Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012.// *Amer. J. Of Infl. Dis*. 9 (3): 77-93 (2013).
169. Stevens J, et al. Receptor specificity of influenza A H3N2 viruses isolated in mammalian cells and embryonated chicken eggs.// *J Virol*. 84(16): 8287–8299 (2010).
170. SunZ, Huber V., Fang Y.Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for influenza virus production.// *J Gen Virol*. 93: 2008–2016 (2012).
171. Suwannakarn K., Chieochansin T., Thongmee C., Molecular Evolution of Human H1N1 and H3N2 Influenza A Virus in Thailand, 2006–2009.// *PLoS ONE* 5; 1 – 8 (2010).
172. Suzuki Y., Saito R, Zaraket H. et al., Rapid and Specific Detection of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses with a Ser31Asn Mutation by the Cycling Probe Method .//*J. Clin. Microbiol*. 48: 57-63 (2010).
173. Takahashi T., Suzuki T., Hidari K.I. et al., A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases.// *FEBS Lett* 543: 71–75 (2003).
174. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N. et al., Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.// *Mol. Biol. Evol*. 28: 2731-2739 (2011).
175. Taubenberger, J.K.; Morens, D.M. "The pathology of influenza virus infections".// *Annu Rev Pathol* 3: 499–522 (2008).
176. Timothy G. Burland., DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis. // *Humana Press Part1*: 71-91 (1999).

177. Tisoncik-Go J., Cordero K. S., Rong L., Analysis of Oseltamivir Resistance Substitutions in Influenza Virus Glycoprotein Neuraminidase using a Lentivirus-Based Surrogate Assay System.// *Virologica Sinica* 28(2): 81-91 (2013).
178. Thompson WW, Shay DC, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States.// *JAMA* 292: 1333–1340 (2004).
179. Tong S, Zhu X, Mang Y. L., New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* 9(10): 1-20 (2013).
180. Tsai H., H. Wang, J. Wang et al., Increasing Appearance of Reassortant Influenza B Virus in Taiwan from 2002 to 2005.// *J Clin Microbiol.* 44(8): 2705–2713 (2006).
181. Varghese J.N., Colman P.M. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 E resolution. // *JMol Biol* 221: 473—486 (1991).
182. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 E resolution. // *Nature* 303: 35-40 (1983).
183. Verhoeyen M., Rompuy L. V., Jou W. M. et al.,. Complete nucleotide sequence of the influenza B/Singapore/222/79 virus hemagglutinin gene and comparison with the B/Lee/40 hemagglutinin.// *Nucleic Acids Res.* 11: 4703-4712 (1983).
184. Vicente D., Cilla G. et al., Rapid spread of drug-resistant influenza A viruses in the Basque Country, northern Spain, 2000-1 to 2008-9.// *Euro Surveill.* 14: 171-184 (2009).
185. Viboud C., Bjornstad O.N., Smith D.L., et al. Synchrony, waves, and spatial hierarchies in the spread of influenza. *Science* 312: 447–451 (2006).
186. Wang J, et al. Exploring organosilane amines as potent inhibitors and structural probes of influenza a virus M2 proton channel.// *J Am Chem Soc.* 133(35): 13844–13847 (2011).
187. Wang Q, Cheng F, Lu M. et al., Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin.// *J Virol.* 82(6): 3011-3020 (2008).
188. Wang J., Wu Y., DeGrado W. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus.// *Proc Natl Acad Sci.* 110(4): 1315–1320 (2013).

189. Wang J., Qiu J.X., Soto C., Structural and Dynamic Mechanisms for the Function and Inhibition of the M2 Proton Channel From Influenza A Virus). // *Curr Opin Struct Biol* 21: 68-80 (2011).
190. Wang Q., 3 Jane Y., Among the four major epitopes that we identified on influenza B virus HA – the 120-loop, the 150-loop, the 160-loop and the 190-helix.// *Influenza: Molecular Virology* : 34-59 (2008).
191. White J.M., Hoffman L.R., Arevalo J.H., et al. Attachment and entry of influenza virus into host cells. Pivotal roles of hemagglutinin.// *Structural Biology of Viruses*. Oxford University Press.: 80–104 (1997).
192. Wiley D. C., Skehel J. J. The Structure and Function of the Hemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus.// *Annu Rev Biochem*. 56: 365-394. (1987).
193. Wiley D. C., Wilson I. A., Skehel J. J., Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation.// *Nature*28 : 9373-9378 (1981).
194. Wilson I.A., Cox N.J., Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. // *Annu Rev Immunol*. 8: 737–787 (1990).
195. Wilson I.A., Ladner R.C. ,Wiley D.C., The structure and role of the carbohydrate moieties of influenza virus hemagglutinin. // *Biochem Soc Trans*. 11: 145–147 (1983).
196. World Health Organization Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012–2013 northern hemisphere influenza season.// *Wkly Epidemiol Rec*. 179. (10): 83–95 (2012).
197. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/annual\\_report\\_2003\\_2004.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/annual_report_2003_2004.pdf)
198. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_feb\\_2005.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2005.pdf)
199. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_mar\\_2006.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_mar_2006.pdf)
200. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_mar\\_2007.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_mar_2007.pdf)
201. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_mar\\_2008.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_mar_2008.pdf)
202. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_feb\\_2009.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2009.pdf)
203. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_feb\\_2010.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2010.pdf)
204. WHO. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2011.pdf>

205. WHO. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2012.pdf>
206. WHO. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/Interim\\_Report\\_February\\_2013.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/Interim_Report_February_2013.pdf)
207. Wiwanitkit V., Structural aberration in HA associated with adaptation of human influenza A H3N2 virus in embryonated chicken eggs.// *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(5): 437-438 (2009).
208. Xu X., Lindstrom S. E., Shaw M. W. et al., Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. // *Virus Res.* 103: 55-60 (2004).
209. Yamashita M, Krystal M, Fitch WM, Palese P Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses.// *Virology* 163 (1): 112–122 (1988).
210. Yen H., Hoffmann E., Taylor G., Importance of Neuraminidase Active-Site Residues to the Neuraminidase Inhibitor Resistance of Influenza Viruses *J Virol.* 80(17): 8787–8795 (2006).
211. Zhong J., Liang L., Huang P. Genetic mutations in influenza H3N2 viruses from a 2012 epidemic in Southern China.// *Virology Journal* 10: 345-352 (2013).
212. Zou S., Prud'Homme I., Weber J.M., Evolution of the hemagglutinin gene of influenza B virus was driven by both positive and negative selection pressures.// *Virus Genes.* 14: 181–185. (1997).

