

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины»**

*На правах рукописи*

Соболев Иван Андревич

**Изменчивость поверхностных гликопротеинов вирусов гриппа А(Н3N2) и В,  
циркулировавших на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.**

*03.02.02-вирусология*

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н. Шестопапов А.М.

Санкт-Петербург

2017

СОДЕРЖАНИЕ .....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1 Классификация и разнообразие вирусов гриппа .....	11
1.2. Морфология вирусов гриппа .....	12
1.3. Геном и белки вируса гриппа .....	13
1.4. Репликация вируса гриппа .....	17
1.5. Поверхностные гликопротеины вируса гриппа .....	22
1.6. Изменчивость вируса гриппа .....	30
1.7. Изменения в первичной структуре HA и NA вирусов гриппа A(H3N2) и B с 2008 по 2013 гг.....	33
1.8. Заключение по обзору литературы.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1 Материалы.....	42
2.2 Методы.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	50
3.1 Анализ изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа A(H3N2).....	51
3.1.1 Молекулярно-генетический анализ изменчивости HA сезонных (эпидемических) штаммов вируса гриппа A(H3N2), выделенных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.....	54
3.1.2 Молекулярно-генетический анализ изменчивости NA сезонных (эпидемических) изолятов вируса гриппа A(H3N2), выделенных на территории Азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.....	68
3.1.3 Динамика изменчивости поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа A(H3N2), изолированных на территории Азиаткой части РФ с 2008 по 2013 гг.....	80
3.2 Анализ изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа B.....	104
3.2.1 Молекулярно-генетический анализ изменчивости HA сезонных (эпидемических) изолятов вируса гриппа B, выделенных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.....	105
3.2.2 Молекулярно-генетический анализ изменчивости NA сезонных (эпидемических) изолятов вируса гриппа B, выделенных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.....	119
3.2.3 Динамика изменчивости поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа B, изолированных на территории Азиаткой части РФ с 2008 по 2013 гг.....	132
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	162

ВЫВОДЫ.....	186
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	188
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	206

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

HA – гемагглютинин

M – матричный белок

NA – нейраминидаза

NP – нуклеопротеид

NS – неструктурный белок

PA – полимеразный белок

PB1 – полимеразный белок 1

PB2 – полимеразный белок 2

вРНК – вирусная РНК

ГАЕ – гемагглютинирующая единица

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кРНК – РНК, комплементарная геномной РНК

мРНК – матричная РНК

н.м. – нанометр

ОТ – обратная транскрипция

п.н. – пара нуклеотидов

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РГА – реакция гемагглютинации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНП – рибонуклеопротеидный комплекс

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

MDCK – культура клеток Madin-Darby Canine Kidney (почка собаки)

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

#### **Актуальность исследования**

Грипп относится к острым респираторным вирусным инфекциям (ОРВИ) и представляет собой одну из наиболее значимых проблем, стоящих перед современной системой здравоохранения. Эпидемический характер заболеваемости гриппом обуславливает ряд проблем социального и экономического характера: смертность в группах риска, резкое повышение нагрузки на персонал учреждений системы здравоохранения и снижение трудовых ресурсов.

Особенности эпидемиологии гриппа во многом объясняются строением вирусного генома. Высокая степень изменчивости генома в результате накопления отдельных мутаций позволяет вирусу уклоняться от специфического иммунитета и вызывать ежегодные эпидемии. Сегментированность генома вируса обуславливает возможность реассортации, которая может приводить к появлению новых вариантов вируса, в том числе наиболее опасных для человеческой популяции пандемических штаммов. Таким образом, особенности генома вируса гриппа позволяют этому патогену ежегодно вызывать сезонные эпидемии, несмотря на профилактические мероприятия (вакцинация) и наличие специфических лекарственных препаратов.

Кроме того, постоянно увеличивающаяся численность человеческой популяции наряду с возможностью быстрого перемещения на значительные расстояния, создают благоприятные условия для циркуляции и распространения вируса гриппа.

Азиатская часть России является крайне интересной для изучения генетических особенностей вируса гриппа, т.к. эта территория характеризуется малой населенностью (относительно европейской части РФ). Население, в основном, сосредоточено в городах, что создает ситуацию, когда районы компактного проживания разделены значительными расстояниями. Это позволяет изучать генетическое разнообразие вируса как на локальном (городском и областном) уровне, так и в более значительных масштабах. Кроме того, азиатская часть РФ географически близка к странам Юго-Восточной Азии, которые крайне плотно заселены и на территориях которых, в основном, начинается ежегодный сезонный подъем заболеваемости гриппом.

При общем обилии вариантов вируса гриппа, зачастую, на конкретной территории циркулируют вирусы, относящиеся к ограниченному числу генетических групп и характеризующиеся наличием определенных мутаций. Именно по этой причине изучение в динамике изменчивости вируса, циркулирующего на конкретной территории, имеет большое значение.

Мировым научным сообществом накоплено большое количество информации о распространении и изменчивости вируса гриппа в человеческой популяции. При этом, новые сезонные варианты вируса, возникающие каждый эпидемический сезон, отличаются не только от циркулировавших ранее, но и от вариантов вируса, циркулирующих одновременно с ними. Это обуславливает важность исследования максимального количества штаммов вируса гриппа. Кроме того, появление в 2009 г. пандемического варианта вируса гриппа обусловило уникальную возможность изучить влияние пандемии на генетическое разнообразие эпидемических (сезонных) вариантов вируса гриппа. При этом эпидемический грипп представлен двумя типами (А и В), которые отличаются динамикой генетической изменчивости.

Современный уровень развития молекулярно-биологических и вычислительных методов исследования позволяют не просто осуществлять анализ циркуляции гриппа, но и изучать патоген на различных уровнях его организации.

#### **Степень разработанности проблемы**

Распространенность вируса гриппа и его изменчивость обуславливают необходимость постоянного надзора за этим патогеном. Научные коллективы по всему миру занимаются изучением генетического и антигенного разнообразия вируса гриппа, его строения, изменчивости, эволюции и патогенеза.

В литературе широко представлены результаты всестороннего изучения вируса гриппа. При всем обилии научных публикаций, изменчивость вируса и совершенствование методов исследования все еще оставляют актуальным изучение этого патогена.

Результаты исследования циркуляции, генетического разнообразия и изменчивости вируса гриппа в человеческой популяции на территории РФ широко представлены в работах российских авторов: О.И. Киселева, Д.К. Львова, А.А. Сомининой, Е.И. Бурцевой, Н.А. Малышева, С.В. Альховского, Э.В. Силуяновой, М.Ю. Щелканова, М.Ю. Еропкина, А.В. Ивановой, Д.М. Даниленко, Т.Г. Лобовой, М.П. Грудина, А. Б. Комиссарова, Л.С. Карповой, Е.А. Смородинцевой, А.М. Шестопалова, Т.Н. Ильичевой, О.Г. Курской и других. При обилии и широте результатов, представленных в работах отечественных авторов, важность и актуальность дополнительных сведений обуславливаются спецификой вируса гриппа и территории РФ. В частности, в работах российских авторов в большей степени представлены результаты исследования штаммов вируса гриппа, изолированных в европейской части страны. Распространенность же вируса гриппа и значительное число случаев инфицирования этим патогеном создают ситуацию, когда из всего разнообразия вариантов вируса, циркулирующих среди людей, исследуется только малая часть. Это усугубляется обширностью территории РФ и географической удаленностью населенных пунктов друг от друга. Таким образом, для

дальнейшего изучения генетического разнообразия, изменчивости и эволюции вируса гриппа важно дополнять уже полученные результаты за счет исследования как можно большего числа генетических вариантов вируса, изолированных в различных регионах.

#### **Цель и задачи исследования**

Целью данного исследования является анализ генетического разнообразия и изменчивости поверхностных гликопротеинов сезонных (эпидемических) вирусов гриппа А(Н3N2) и В, циркулировавших в человеческой популяции на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.

Задачи:

1) Определить первичные структуры генов, кодирующих поверхностные гликопротеины штаммов вирусов гриппа типов А (Н3N2) и В, выделенных на территории азиатской части РФ (2008-2013 гг.).

2) Определить генетическое разнообразие (типы, субтипы, клады и группы) выделенных изолятов вируса гриппа.

3) На основе первичной структуры сегментов 4 и 6 вирусного генома осуществить молекулярно-генетический анализ структуры НА и NA и установить филогенетические связи исследованных изолятов вируса гриппа А.

4) Охарактеризовать генетическую изменчивость НА и NA, а также определить паттерн накопления аминокислотных замен в поверхностных гликопротеинах.

5) Определить корреляцию между пандемией вируса гриппа А(Н1N1) pdm09 и изменением генетического разнообразия эпидемических вирусов гриппа А(Н3N2) и В.

6) На основе анализа первичной структуры белка NA осуществить поиск известных аминокислотных замен, ассоциированных со снижением чувствительности вирусов гриппа А (Н3N2) и В к ингибиторам нейраминидазы.

#### **Научная новизна работы**

В первую очередь новизна полученных результатов формируется за счет привязки исследований к конкретной территории и по причине изменчивости и распространенности вируса гриппа.

1) Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу 29 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и 33 штаммов гриппа В, выделенных в азиатской части РФ.

2) Выявлены паттерны накопления мутаций в поверхностных гликопротеинах вируса гриппа и обнаружены позиции, по которым происходило накопление аминокислотных замен, ассоциированных с изменением антигенных свойств вируса, а следовательно, с уклонением от иммунного ответа организма-хозяина.

3) Показана корреляция между пандемией вируса гриппа А(Н1N1) pdm09 и изменением в паттерне изменчивости поверхностных гликопротеинов пула циркулировавших на территории азиатской части РФ вирусов гриппа А(Н3N2) и В.

4) Определена степень генетической идентичности поверхностных гликопротеинов всех исследованных штаммов и вакцинных штаммов рассматриваемых эпидемических сезонов.

5) Выявлена гетерогенность (по поверхностным гликопротеинам) пула циркулировавших вариантов вируса гриппа.

6) Показана динамика изменчивости вирусов гриппа А(Н3N2) и В, изолированных на территории Азиатской части России.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В ходе работы определены первичные структуры генов НА и NA сезонных вирусов гриппа, изолированных в азиатской части РФ в предпандемический и постпандемические сезоны. Эти последовательности являются важным дополнением к существующему пулу известных геномов вирусов гриппа и, благодаря размещению в открытых международных базах данных GenBank и GISAID, включаются в глобальную картину эволюционной изменчивости вирусов гриппа, циркулировавших в человеческой популяции.

Создана и принята на патентное депонирование в Коллекцию микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» коллекция штаммов вируса сезонного гриппа различных типов/субтипов, циркулировавших в азиатской части РФ в 2008-2013 гг., которые могут быть использованы для приготовления диагностических препаратов, а также для сравнительного анализа биологических свойств штаммов.

Немаловажным фактом является выявление корреляции между появлением пандемического варианта вируса и изменением генетического разнообразия эпидемических вирусов, т.к. изменение состава пула циркулировавших вирусов напрямую связано с составом вакцин от гриппа.

#### **Методология и методы исследования**

В работе использованы классические вирусологические методы (выделение и амплификация вируса в культуре клеток MDCK, постановка реакции гемагглютинации, реакции торможения гемагглютинации), молекулярно-биологические методы (выделение РНК, обратная транскрипция, ПЦР и ПЦР в реальном времени; гель-электрофорез, секвенирование), а также разнообразные методы компьютерного анализа (множественные выравнивания последовательностей, построение филогенетических дендрограмм и филогенетических сетей, оценка дистанций между штаммами, моделирование пространственных структур НА и NA). Более подробно способы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».



**Положения, выносимые на защиту:**

1) На территории азиатской части РФ в течение эпидемических сезонов 2008-2009 гг., 2010-2011 гг., 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг. в человеческой популяции циркулировали вирусы гриппа А(Н3N2), А(Н1N1) (сезонный вариант, обнаруживался в сезон 2008-2009), А(Н1N1) pdm09 (пандемический вариант, обнаруживался с сезона 2009-2010 гг.) и В.

2) Структура филогенетических связей исследованных изолятов вирусов гриппа А(Н3N2) и В указывает на гетерогенность вирусной популяции и свидетельствует о множественных заносах различных вариантов патогена на территорию азиатской части РФ.

3) В течение пандемического сезона 2009-2010 гг. (пандемия вируса гриппа А(Н1N1) pdm09) и постпандемического сезона 2010-2011 гг. в азиатской части РФ произошло значительное изменение генетического разнообразия вирусов гриппа А(Н3N2) и В.

4) В течение всех четырех эпидемических сезонов накопление аминокислотных замен в поверхностных гликопротеинах исследованных изолятов вируса гриппа происходило по ограниченному числу позиций, в основном расположенных в антигенных сайтах, мутации в которых ассоциированы с изменением антигенных свойств вируса.

**Личный вклад автора.**

Выявление РНК вирусов гриппа методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Выделение и культивирование вируса гриппа на культуре клеток MDCK. Детекция вируса в культуральной жидкости (в реакции гемагглютинации). Изучение активности нейраминидазы и ее ингибирования. Молекулярно-биологический этап работы: выделение вирусной РНК, обратная транскрипция, амплификация сегментов вирусного генома посредством ПЦР, определение нуклеотидных последовательностей НА и NA. Аналитический этап работы: выравнивание, молекулярно-генетический и филогенетический анализ последовательностей.

**Степень достоверности и апробация результатов.**

Материалы диссертации были представлены на 2-й международной конференции «Астана биотех 2011» (Астана, 2011); на международной конференции «Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance» (Rio de Janeiro, Brazil, 2011); на международной конференции «4th Oxford International influenza conference «Influenza 2011» (Oxford, UK, 2011); на международном симпозиуме «XIV International Symposium on Respiratory Viral Infections» (Istanbul, Turkey, 2011); на международной конференции «Incidence, Severity, and Impact: an isirv International Conference on Seasonal and Pandemic Influenza» (Munich, Germany, 2012); на международной конференции «4th International Influenza Meeting» (Munster, Germany, 2014); на научно-практической конференции–биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение» (Санкт-Петербург, 2014).

**Публикации.**

Результаты диссертации отражены в 20 печатных работах, в том числе в 6 статьях в 4 реферируемых российских журналах из списка ВАК и в 2 международных журналах, а также в тезисах докладов на российских и международных конференциях.

**Структура и объем диссертации.**

Диссертация изложена на 225 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, список литературы и приложения.

Диссертация иллюстрирована 46 таблицами и 48 рисунками. Список литературы включает 228 источников, в том числе 222 работы зарубежных авторов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Классификация и разнообразие вирусов гриппа

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae и характеризуются сегментированным одноцепочечным РНК-геномом негативной полярности (Baltimore, 1971; Pons, 1971; King, 2012). К семейству Orthomyxoviridae относятся три рода (типа) вирусов гриппа: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* и *Influenzavirus C* (разделение на роды основывается на отличиях в структуре внутренних белков – нуклеопротеина и матриксного белка) (Kawaoka, 2005), а также роды *Thogotovirus*, *Isavirus* и *Quaranjavirus* (ICTV, 2015). Возможно, скоро будет выделен еще один род вируса гриппа – *Influenzavirus D*, т.к. вирус C/OK (C/swine/Oklahoma/1334/2011), ранее включенный в тип С и изолированный от крупного рогатого скота и свиней, на самом деле характеризуется значительными генетическими отличиями от вирусов гриппа типа С, ранее изолированных от людей (Hause, 2014). Штаммы вируса гриппа D были от крупного рогатого скота в Соединенных Штатах (Hause et al., 2014; Collin et al., 2015; Ferguson et al., 2015; Ng et al., 2015), Китае (Jiang et al., 2014), Японии (Murakami et al., 2016), Мексике (Mitra et al., 2016), Италии (Chiapponi et al., 2016) и Франции (Ducatez et al., 2015). Кроме того, у КРС, а также у мелких жвачных животных в Северной Америке были выявлены антитела против вируса гриппа D (Hause et al., 2014). Было показано, что вирус гриппа D инфицирует и других млекопитающих, таких как морские свинки и хорьки (Sreenivasan et al., 2015). У 94-97% людей, тесно работающих с КРС, также были обнаружены антитела к вирусу гриппа D (Ferguson et al., 2015; White et al., 2016).

Вирус гриппа типа А был выделен от птиц, а также людей и других млекопитающих. Вирусы гриппа типов В и С циркулируют преимущественно в человеческой популяции, но известны случаи обнаружения этих вирусов у морских млекопитающих (грипп типа В у тюленей), собак и свиней (грипп типа С) (Tumova, 1968; Kimura, 1997; Osterhaus, 2000; Wright, 2007). В отличие от вирусов гриппа типов А и В, грипп типа С обнаруживается редко и вызывает более легкую форму заболевания, в основном у детей (Matsuzaki, 2006; Hampson, 2002).

Вирус гриппа типа А подразделяется на субтипы исходя из комбинаций поверхностных гликопротеинов – гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). Природным резервуаром вируса гриппа типа А являются дикие водоплавающие птицы, среди которых и циркулирует значительное количество антигенно различных вариантов вируса (Webster, 1992). Известно о выделении от диких водоплавающих птиц 16 субтипов гемагглютинина и 9 субтипов нейраминидазы (Fouchier, 2005) (Webster, 1992). Кроме того, у летучих мышей было обнаружено по два новых субтипа НА (Н17 и Н18) и НА (N10 и N11) (Щелканов, 2012; Tong, 2013; Wu, 2014).

Большинство эпидемий и все известные пандемии (эпидемия, охватывающая значительные географические области, включающие в себя несколько стран; возникает, когда в человеческую популяцию попадает вирус с белком НА, к которому в популяции отсутствуют антитела (Kilbourne, 1977), были вызваны вирусом гриппа типа А, т.к. именно он обладает наибольшей антигенной изменчивостью и способен инфицировать широкий спектр хозяев. Вирус гриппа типа В характеризуется меньшей степенью антигенной изменчивости, которая иногда приводит к эпидемиям. Вирус гриппа типа С наиболее антигенно стабилен и обнаруживается редко. Заболевание, вызываемое им, обычно протекает в легкой форме.

## **1.2. Морфология вирусов гриппа**

Вирусные частицы плеоморфны и в основном характеризуются сферической формой (диаметр 80-120 нм) (Fujiyoshi, 1994), хотя зачастую у клинических изолятов на начальных этапах пассирования встречается нитевидная форма (Choppin, 1960) длиной свыше 300 нм.

Оболочка вириона образована липидным бислоем, который формируется из плазматической мембраны клетки-хозяина. Липидная оболочка вируса гриппа типа А снаружи покрыта поверхностными гликопротеинами – гемагглютинином (НА) и нейраминидазой (NA) и пронизана ионными каналами, образованными тетрамерами интегрального мембранного белка М2 (Рис. 1) (Webster, 1992; Pinto, 1992; Zebedee, 1988.). Гемагглютинин (НА) является основным поверхностным белком вируса гриппа (около 80%) и формирует тримерные шипы, несущие рецептор-связывающие сайты (Steinhauer, 1998). Нейраминидаза (NA) – второй по распространенности (около 17%) поверхностный белок вируса гриппа, формирующий тетрамерные шипы (Lamb, 2001; Varghese, 1983). Третьим по распространенности (16-20 молекул на вирион) белком вирусной оболочки является тетрамерный белок ионных каналов – М2 .

С внутренней стороны липидная оболочка вириона выстлана матричным слоем, состоящим из наиболее распространенного вирусного белка – М1. М1 связан с пронизывающими оболочку белками НА, NA и М2 с внешней стороны и с вирусной РНК и NP-белком с внутренней стороны (Ruigrok, 1989; Nayak, 2009; Rossmann, 2011).

Центральную часть вириона вируса гриппа занимают спиральные рибонуклеопротеиновые комплексы, состоящие из сегментов вирусной РНК, нуклеопротеина (NP), ядерного экспортного белка (NEP) и белков полимеразного комплекса 3Р (PB1, PB2 и PA) (Baudin, 1994; Martin-Benito, 2001; Compans, 1972; Klumpp, 1997; Noda, 2010; Zheng, 2013).

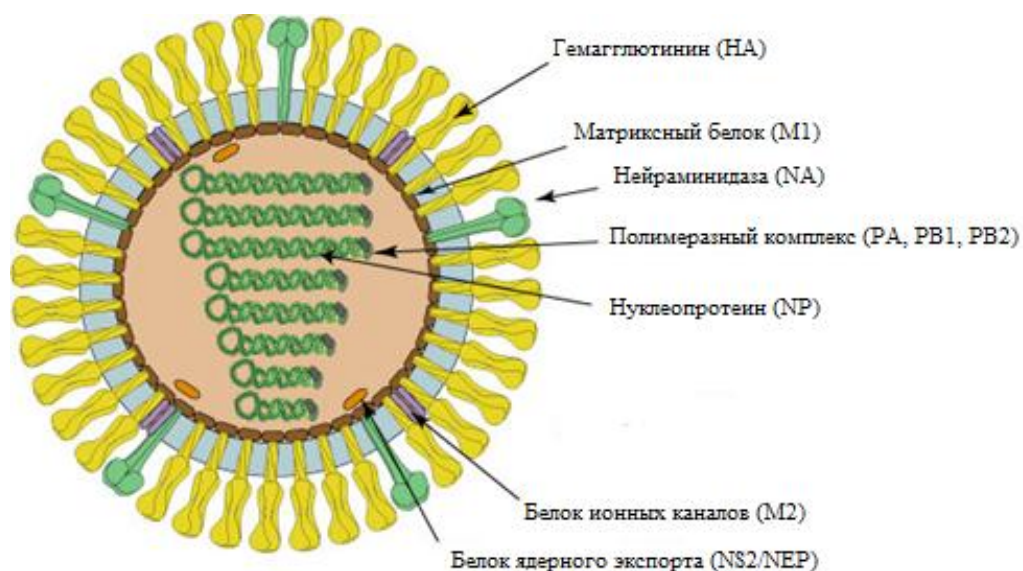


Рисунок 1. Строение вириона вируса гриппа (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://viralzone.expasy.org>)

### 1.3. Геном и белки вируса гриппа

Сегментированный геном вируса гриппа А состоит из восьми сегментов одноцепочечной РНК отрицательной полярности (Рис. 2). Размер сегментов – от 890 до 2,341 п.н., а общий размер генома – 13,5 т.п.н.. Белков у вируса гриппа А больше чем сегментов генома (на данный момент известно о 17). Известен ряд механизмов, которые позволяют экспрессировать несколько белков с одного сегмента генома – альтернативный сплайсинг, альтернативная инициация трансляции и рибосомный сдвиг.

Если распределить сегменты в порядке уменьшения, то три наибольших сегмента РНК (1, 2 и 3) кодируют белки полимеразного комплекса: РВ2 (кодируется первым сегментом РНК), РВ1 (второй сегмент) и РА (третий сегмент). Кроме того, сегментом 1 кодируется белок РВ2-S1 (является результатом альтернативного сплайсинга). Сегмент 2 кроме РВ1 кодирует еще два белка, которые не являются обязательными белками вириона и экспрессируются в результате альтернативной инициации трансляции: РВ1-F2и РВ1-N40. Сегмент 3 также кодирует дополнительный белок РА-X (экспрессия происходит при рибосомном сдвиге рамки +1). Третьим сегментом дополнительно кодируются белки РА-N155 и РА-N182 (экспрессия обуславливается альтернативной инициацией трансляции). Сегменты 4, 5 и 6 кодируют по одному белку: гемагглютинин (НА), белок нуклеокапсида – нуклеопротеин (NP) и нейраминидазу (NA) соответственно. Сегменты генома 7 и 8 кодируют мРНК, подвергающуюся альтернативному сплайсингу, который обуславливает экспрессию нескольких белков с каждого сегмента генома (Lamb, 1979; Lamb, 1980). Несплайсированный вариант мРНК сегмента 7 кодирует матриксный белок (M1), а сплайсированный – белок ионных каналов (M2). Кроме того, возможна замена M2 на другой сплайсированный вариант – M42. Несплайсированный

вариант мРНК 8 сегмента кодирует многофункциональный неструктурный белок NS1, сплайсированный же – ядерный экспортный белок NS2/NEP.

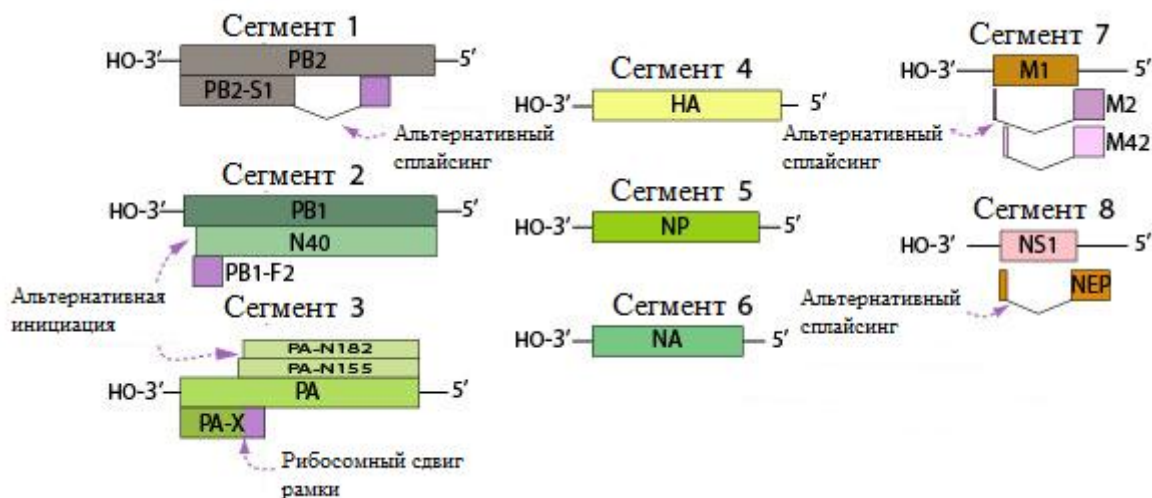


Рисунок 2. Структура генома вируса гриппа типа А (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://viralzone.expasy.org>)

Сегментами генома вируса гриппа А кодируются белки:

#### Сегмент 1:

PB2 – субъединица полимеразного комплекса, распознает и взаимодействует с 5'-кэпом пре-мРНК клеток организма-хозяина для использования в качестве праймеров в транскрипции вирусных мРНК (Webster, 1992).

PB2-S1 - обнаруживается в инфицированных клетках, локализуется в митохондриях и ингибирует RIG-I-зависимый сигнальный путь интерферона (Kawaoka, 2015).

#### Сегмент 2:

PB1 – субъединица полимеразного комплекса, обеспечивающая элонгацию при синтезе вирусных РНК и мРНК (Webster, 1992).

PB1-F2 – проапоптотический фактор вирулентности, ингибитор индукции интерферона I типа (Chen, 2001; Henklein, 2005).

PB1-N40 – белок, связанный с ускорением репликации вируса в клеточных культурах (Wise, 2009).

#### Сегмент 3:

PA – субъединица полимеразного комплекса, обладающая эндонуклеазной активностью - расщепляет клеточные мРНК, 5'-кэпI-структуры которых связаны с PB2 субъединицей. (Dias, 2009; Yuan, 2009).

PA-X – обладает эндонуклеазной активностью (но отличающейся от активности белка PA), модулирует иммунный ответ, связан с увеличением тяжести заболевания и с более

выраженными клиническими проявлениями заболевания (Jagger, 2012; Bavagnoli, 2015; Hayashi, 2015).

PA-N155 и PA-N182 - обнаруживаются в инфицированных клетках и предположительно обуславливают нормальную репликацию вируса и его патогенность (мутантные вирусы гриппа, лишенные этих белков, характеризуются замедленной репликацией в клеточной культуре и сниженной патогенностью на мышинной модели) (Muramoto, 2013).

#### Сегмент 4:

HA – интегральный мембранный гликопротеин, основной поверхностный антиген вируса гриппа. Обеспечивает связывание вириона с клеточными рецепторами и слияние оболочек вириона и клетки для рецептор-опосредованного эндоцитоза рибонуклеопротеиновых комплексов (Webster, 1992).

#### Сегмент 5:

NP – основной компонент рибонуклеопротеинового комплекса, связывается с вновь синтезированными вирусными РНК в клеточном ядре, входит в состав транскриптазного комплекса наряду с PB1, PB2 и PA, принимает участие в репликации вирусной РНК (Webster, 1992).

#### Сегмент 6:

NA – интегральный гликопротеин оболочки, отщепляет концевые сиаловые кислоты гликопротеинов и гликолипидов посредством гидролитического расщепления гликозидных связей. Обеспечивает распространение вируса в результате его выхода из инфицированных клеток и отщепления от клеточных рецепторов (Webster, 1992).

#### Сегмент 7:

M1 – матриксный белок, выстилающий изнутри липидный бислой оболочки вириона и обеспечивающий ее структурную стабильность (Webster, 1992).

M2 – интегральный мембранный белок, формирующий ионные каналы. Тетрамеры этого белка в больших количествах обнаруживаются в оболочках инфицированных клеток и в меньших – в оболочках вирионов. Обеспечивает контроль уровня pH в аппарате Гольджи во время синтеза HA и повышение кислотности внутри вириона для декапсидации вируса (Webster, 1992).

M42 - функционально аналогичен белку M2 и отличается от него эктодоменом. (Wise, 2012)

#### Сегмент 8:

NS1 – неструктурный многофункциональный белок. Ингибитор RIG-I-рецепторов, антагонист интерферона (Mibayashi, 2007; Guo, 2007; Opitz, 2007). Нарушает экспрессию генов организма-хозяина посредством ингибирования полиаденилирования клеточных мРНК (Colgan,

1997; Nemeroff, 1998), что нарушает антивирусный ответ на посттранскрипционном уровне (Das, 2008; Noah, 2003). Стимулирует синтез вирусных РНК (Min, 2007).

NS2/NEP – неструктурный белок, участвует в ядерном экспорте вирусных рибонуклеопротеиновых комплексов, которые синтезируются в ядре инфицированной клетки и затем включаются в состав новых вирионов на клеточной мембране (O'Neill, 1998). Кроме того, NS2 задействован в процессах регуляции транскрипции и репликации вирусной РНК (Paterson, 2012).

Геном вируса гриппа типа В также состоит из 8 сегментов одноцепочечной РНК отрицательной полярности (Рис. 3), кодирующими 11 белков. Размер сегментов – от 890 до 2,341 п.н.. Общий размер генома - 13.5 т.п.н..

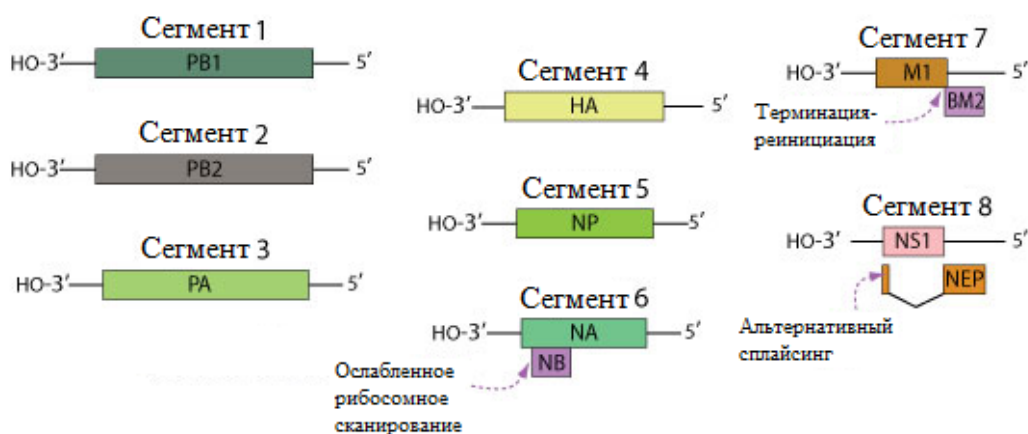


Рисунок 3. Структура генома вируса гриппа типа В (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://viralzone.expasy.org>)

В целом строение генома вируса гриппа В схоже с геномом вируса гриппа А, но существует ряд отличий. Белки PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M1, NS1 и NS2/NEP по своим функциям схожи с аналогичными белками вируса гриппа А. Большинство сегментов генома кодируют по одному белку, но сегменты 6, 7 и 8 каждый кодируют по два белка. Более подробно будут рассмотрены сегменты 6 и 7, т.к. именно ими кодируются белки, отличающие вирус гриппа В от вируса гриппа А. Сегмент 6 кодирует белки NA и NB (Williams, 1989).

Наличие белка NB отличает вирус гриппа В от вируса гриппа А. NB – интегральный мембранный белок, который обнаруживается как на поверхности инфицированных клеток (Betakova, 1996; Shaw, 1983; Sunstrom, 1996) так и в составе оболочек вирионов (Brassard, 1996). Синтезируется в результате альтернативной инициации трансляции. Ранее предполагалось, что этот белок формирует ионные каналы и функционирует подобно белку M2 вируса гриппа типа А, обеспечивая процесс репликации вируса посредством участия в «раздевании» вируса и проникновении его в клетку (Fischer, 2000; Sunstrom, 1996). Но, сейчас существуют сомнения в том, что белок NB выполняет функции ионного канала - было обнаружено, что нокаут по гену



NB не оказывает влияния на рост вируса в клеточной культуре (в отличие от белка M2), хотя и повышает эффективность репликации вируса при инфицировании мышей (Hatta, 2003). В более поздней же работе (Elderfield, 2015) было показано, что репликация нокаутного по гену NB вируса не отличается от репликации вируса дикого типа. Более того, при инфицировании мышей и хорьков разными вариантами вируса – не выявлено преимуществ вируса дикого типа над нокаутным. Аналогичный результат был получен при оценке трансмиссивности вируса – нокаутный вариант успешно передавался воздушно-капельным путем между хорьками. Таким образом, на данный момент роль NB-белка в жизненном цикле вируса гриппа В остается не выясненной.

Сегмент 7 кодирует белки M1 и M2. Экспрессия обеспечивается перекрытием стоп-кодона M1 (. . . UAA UG) со старт-кодом M2 (UA AUG . . .) (Shaw, 1983). Белок M2 формирует ионные каналы и выполняет функцию, аналогичную функции белка M2 вируса гриппа типа А.

#### **1.4. Репликация вируса гриппа**

Наиболее хорошо изучены вирусы гриппа А. Поэтому процесс репликации будет рассматриваться именно для этого типа вируса гриппа. У вируса гриппа типа В схожие с гриппом типа А организация генома и основные белки, что обуславливает сходство механизмов, обеспечивающих репликацию.

Процесс репликации начинается с адсорбции вириона на клеточной мембране (Рис.4). Вирус гриппа распознает на поверхности клеток олигосахариды, несущие остатки сиаловой кислоты и связывается с ними посредством рецептор-связывающего сайта молекулы гемагглютинина. Различные рецепторы и их афинность к разным вариантам гемагглютинина играют ключевую роль в формировании видоспецифичности, трансмиссивности и патогенности вирусов гриппа. Так, вирусы гриппа человека взаимодействуют с  $\alpha 2,6$ -рецепторами, которые обнаруживаются на поверхности клеток эпителия верхних отделов дыхательных путей человека (Couseiro, 1993), а вирусы гриппа птиц преимущественно связываются с  $\alpha 2,3$ -рецепторами, которые присутствуют на поверхности эпителиальных клеток в кишечнике птиц (Rogers, 1983). Это является одним из барьеров, затрудняющих передачу патогена между видами, несмотря на то, что в нижних отделах дыхательных путей человека были обнаружены как  $\alpha 2,6$ - так и  $\alpha 2,3$ -рецепторы (Shinya, 2006). Взаимодействие вируса гриппа с клеточными рецепторами более подробно рассмотрено в разделе 1.5.3 "*Функциональность поверхностных гликопротеинов*".

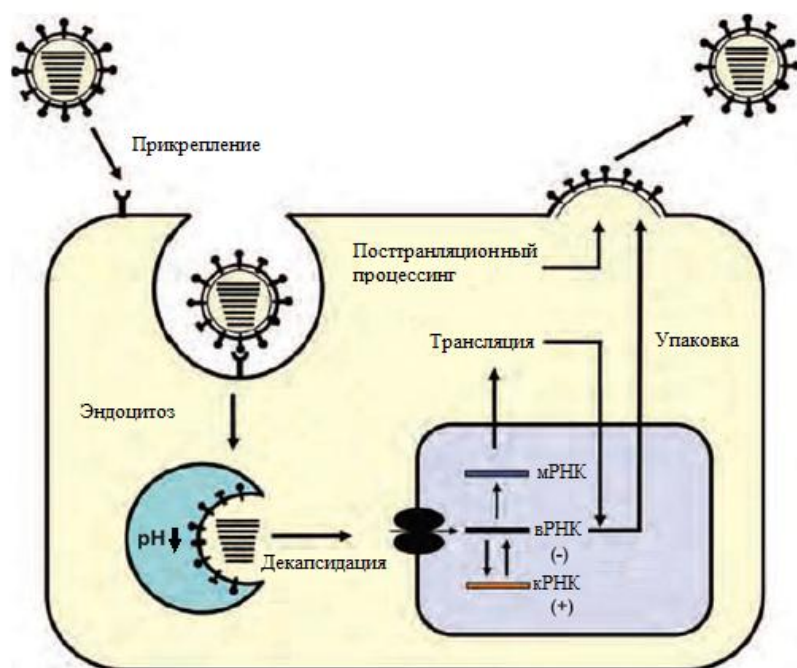


Рисунок 4. Репликация вируса гриппа (David M. Knipe. Fields Virology, 2013)

Рецептор-опосредованный эндоцитоз инициируется связыванием лиганда с рецептором (Matlin, 1981; Rust, 2004). Для «раздевания» или декапсидации вируса необходимо выполнение двух критериев: расщепление молекулы НА протеазой на субъединицы НА1 и НА2 (Scholtissek, 1986; Klenk, 1994) и снижение pH примерно до 5,0. Низкий pH вызывает необратимые конформационные изменения расщепленной молекулы НА: «пептид слияния», расположенный на N-конце субъединицы НА2 и состоящий из гидрофобных аминокислотных остатков, смещается и встраивается в клеточную мембрану. Это обеспечивает слияние мембраны вириона с мембраной эндосомы (Carr, 1993; Bullough, 1994). Кроме того, происходит нарушение взаимодействия между матриксным белком М1 и рибонуклеопротеинами, что приводит к высвобождению вирусных РНП в цитоплазму клетки. Затем рибонуклеопротеиновые комплексы с помощью белка NS2(NEP) транспортируются в ядро клетки, где осуществляется транскрипция (Martin, 1991).

#### Транскрипция (синтез вирусной мРНК)

Как в вирионах, так и в инфицированных клетках вирусная РНК находится в составе РНП комплексов, в которые также входят: множественные копии белка NP и тримерный РНК-зависимый РНК полимеразный комплекс, состоящий из белков PB1, PB2, и PA и осуществляющий процесс транскрипции (Рис. 5). Примечательно, что все сегменты вРНК характеризуются наличием одинаковых консервативных последовательностей из 13 нуклеотидов на 5' и 12 нуклеотидов на 3' концах. Между собой эти последовательности частично комплементарны.

Характерной особенностью вируса гриппа является то, что в отличие от ряда других вирусов с негативным РНК-геномом (например: парамиксовирусов), синтез его мРНК зависит от активности клеточной РНК-полимеразы II. Это связано с тем, что транскриптаза вируса гриппа не может инициировать синтез мРНК, экпировать ее 5'-конец и присоединить к нему метильную группу (Krug, 1989). Поэтому для инициации транскрипции вирусом гриппа используются уже экпированные и метилированные клеточные пре-мРНК, которые синтезируются клеточной РНК-полимеразой II.

Связывание консервативной последовательности на 5' конце вРНК с PB1 субъединицей полимеразного комплекса активирует как способность PB2-белка связываться с 5'-кэпом клеточной пре-мРНК, так и эндонуклеазную активность PA-субъединицы. Затем эндонуклеазой вирусного полимеразного комплекса осуществляется гидролитическое отщепление экпированного и метилированного участка 5'-конца клеточной пре-мРНК (Plotch, 1981). В ходе этого процесса экпированный 5'-конец пре-мРНК связывается с PB2 субъединицей полимеразного комплекса (Guilligay, 2008; Ulmanen, 1981), после чего осуществляется гидролиз эндонуклеазой, расположенной в N-концевом домене белка PA (Dias, 2009; Yuan, 2009). Показано, что расщепление преимущественно происходит после одной и той же нуклеотидной последовательности – (...CA) (Beaton, 1981; Shaw, 1984; Rao, 2003). В результате отсекается фрагмент размером 10-13 нуклеотидов, который и будет использоваться в качестве праймера для инициации транскрипции (Bouloy, 1978).

Связанные с PB1 белком полимеразного комплекса 5' и 3' концы вРНК образуют несколько комплементарных пар оснований и формируют частично двуцепочечную структуру, которая необходима для инициации транскрипции вРНК (Rao, 2003; Fodor, 1994; Hagen, 1994; Flick, 1996). Матрицей для инициации транскрипции является 3'-конец (3'-UCGUUU...) вирусной РНК, связанной с белком PB1 в составе вирусного полимеразного комплекса (Li, 1998; Gonzalez, 1999). Непосредственно транскрипция начинается с добавления к 3'-концу экпированного праймера остатка гуанина, который комплементарен цитозину вирусной РНК (матрицы для транскрипции). Элонгация транскрипции осуществляется PB1-субъединицей полимеразного комплекса при считывании матрицы в направлении 3'-5' (Fodor, 1994; Hagen, 1994), при этом 5'-конец матрицы остается связанным с PB1-субъединицей.

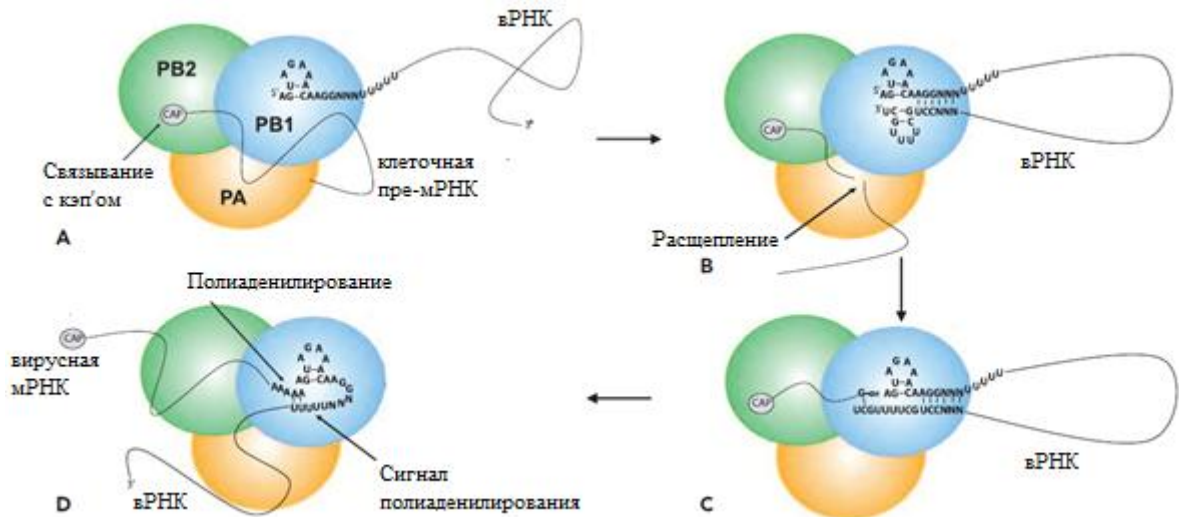


Рисунок 5. Синтез вирусной мРНК (David M. Knipe. Fields Virology, 2013)

### Сплайсинг

Сплайсинг относится к посттранскрипционному процессингу вирусных мРНК и позволяет продуцировать по несколько белковых продуктов с отдельных сегментов генома (раздел 1.3), что расширяет его возможности. Вирусы гриппа задействуют клеточный механизм сплайсинга. Но если сравнивать эффективность сплайсинга клеточных мРНК и вирусных, то у последних она снижена, т.к. необходимо поддерживать экспрессию белков как со сплайсированной формы мРНК, так и с несплайсированной.

### Трансляция

Процесс транскрипции происходит в ядре клетки-хозяина, после чего новые вирусные мРНК попадают в цитоплазму. В цитоплазме рибосомами клетки осуществляется трансляция мРНК. Синтезированные белки частично транспортируются в ядро клетки (PB1, PB2, PA, NS1, NS2 и NP), белок M1 накапливается в цитоплазме, а белки HA, NA и M2 перемещаются на периферию и встраиваются в клеточную мембрану (Smith, 1987; Jones, 1986; Melen, 2003; de la Luna, 1995).

### Репликация vРНК

Процесс репликации vРНК (Рис. 6) можно разделить на две стадии: синтез комплементарной РНК (кРНК) положительной полярности по матрице vРНК и синтез vРНК отрицательной полярности по матрице кРНК. В синтезе кРНК задействованы белки PB1 и NP (Nakagawa, 1996). Синтезированные кРНК отличаются от вирусных мРНК (продукт транскрипции) структурой конечных районов – они не содержат кэпированных и метилированных праймерных последовательностей и являются полностью комплементарными концам vРНК. Сегменты кРНК в свою очередь служат матрицами для синтеза новых точных копий сегментов геномной РНК вируса (vРНК). В синтезе vРНК кроме белков PB1 и NP также принимает участие PA-белок (Nakagawa, 1996)

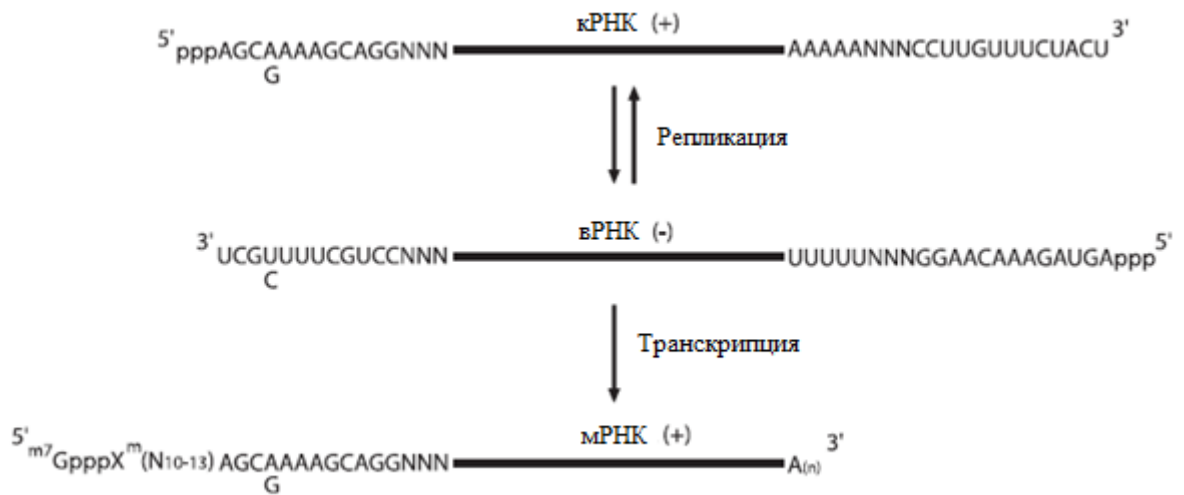


Рисунок 6. Репликация вирусной РНК (David M. Knipe. Fields Virology, 2007)

### Регуляция экспрессии вирусных генов

Накопление мРНК с восьми сегментов генома вируса гриппа происходит неравномерно. Но остается неясным, является ли это последствием повышения уровня транскрипции для отдельных сегментов (Enami, 1985; Hatada, 1989) или же отражает различные темпы синтеза вРНК (Shapiro, 1987; Smith, 1982) или стабильности РНК. Известно, что синтез как мРНК так и белков NP и NS1 повышен на ранних стадиях цикла репликации вируса гриппа, в то время как синтез HA, NA и особенно M1 замедлен (Hatada, 1989; Hay, 1977; Shapiro, 1987; Smith, 1982). Отличия в уровне экспрессии отражают значение разных белков на различных этапах жизненного цикла вируса. Так белок NP задействован в репликации (в синтезе мРНК и вРНК), а NS1 – в подавлении иммунного ответа организма-хозяина, т.е. эти белки необходимы на начальном этапе жизненного цикла вируса. Синтез M1 замедлен на ранних стадиях репликации вируса, т.к. он является супрессором транскрипции вРНК (Perez, 1998; Watanabe, 1996), а также вовлечен в транспорт рибонуклеопротеинов из ядра клетки в цитоплазму (Martin, 1991), что является необходимым уже после завершения репликации.

Строение промотора вРНК обуславливает различия в уровне экспрессии разных сегментов генома. В положении 4 на 3'-конце вРНК обнаружена вариация C/U. Сегменты РНК, кодирующие белки PB1, PB2 и PA содержат «С» в этой позиции, в то время как другие сегменты обычно содержат «U». Структурный анализ промоторов типа С4 и U4 показал отличия, которые могут обуславливать различия во взаимодействии с полимеразой и, следовательно, оказывать влияние на экспрессию генов (Lee, 2003). Показано, что С4-промотор связан со снижением транскрипции и стимуляцией репликации относительно U4-промотора (Lee, 1998).

### Сборка вирионов и их отпочковывание от клетки

Сборка вирионов осуществляется в цитоплазме клетки, непосредственно у клеточной мембраны: vРНК с белками полимеразного комплекса и белком NP образуют РНП-комплексы, которые экспортируются из ядра в цитоплазму и вместе с остальными белками вируса формируют вирион. В каждый вирион упаковываются все восемь сегментов генома вируса, что обеспечивается специфическими сигналами, уникальными для каждого сегмента РНК (Hutchinson, 2010; Noda, 2012).

Сформированные вирионы отпочковываются от клеточной мембраны посредством отщепления концевых сиаловых кислот гликопротеинов и гликолипидов белком NA вируса, что приводит к высвобождению вирусных частиц от клеточных рецепторов и предотвращает их взаимодействие (Webster 1992; Shtyrya, 2009).

## **1.5. Поверхностные гликопротеины вируса гриппа**

### 1.5.1 Структура поверхностных гликопротеинов

Гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), напоминающие формой шипы, покрывают поверхность вирионов вируса гриппа. На вирусных частицах сферической формы располагается примерно 500 шипов HA и 100 шипов NA. Как HA так и NA распределены по поверхности вириона, но шипы нейраминидазы преимущественно сконцентрированы в области высвобождения вириона от клеточной мембраны (Calder, 2010). Поверхностные гликопротеины закреплены в оболочке вириона посредством 27-29 незаряженных аминокислот, пронизывают мембрану и взаимодействуют с матричным белком M1 (размер «внутренней» части шипа составляет 11 оснований для HA и 6 – для NA.) (Rossman, 2011).

HA – поверхностный гликопротеин I типа, характеризующийся сигнальной последовательностью на N-конце и якорной последовательностью (закреплена в мембране вириона) на C-конце.

Гемагглютинин представляет собой тример (Рис. 7), сформированный из одинаковых субъединиц, состоящих из 540-550 аминокислот (Wiley, 1987). Белок HA синтезируется на рибосомах эндоплазматического ретикулама (ЭР) клетки-хозяина и, после распознавания сигнальной последовательности, транспортируется через мембрану ЭР в цитоплазму (Gallagher, 1992) и интегрируется в клеточную мембрану. HA синтезируется в виде молекулы HA0 массой около 80 кДа и затем расщепляется клеточными протеазами на два полипептида – HA1 с относительной молекулярной массой 55 кДа и HA2 (25 кДа), при этом HA1 и HA2 остаются соединенными дисульфидными мостиками (Klenk, 1994). HA1 (у вирусов гриппа типа А состоит из 328 аминокислот, а у вирусов гриппа типа В – из 342), сохраняет N-концевую последовательность HA0 и приобретает новый C-конец. HA2 (221 аминокислота у вирусов гриппа типа А и 169 – у вирусов гриппа типа В), приобретает новый N-конец и сохраняет C-

концевую последовательность HA0 (Wiley, 1987) (Wang, 2008). Расщепление HA0 необходимо для взаимодействия с клеточной мембраной и, следовательно, обуславливает инфекционность вируса гриппа (Klenk, 1994).

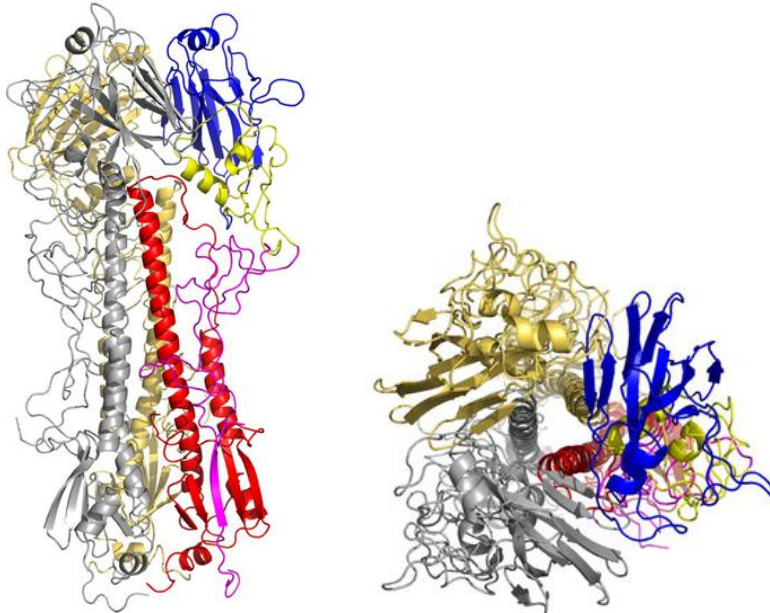


Рисунок 7. Структура HA вируса гриппа. Желтым и серым цветом отмечены два из трех мономеров. Домены третьего мономера окрашены в разные цвета: синий – рецептор-связывающий сайт, желтый – рудиментарная эстераза, красный и фиолетовый – субдомены слияния. (Gamblin and Skehel. *Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins*)

Шип HA, состоящий из трех субъединиц, выступает над поверхностью вириона на 130 Å и содержит стеблеобразную мембранно-проксимальную часть (сформирована главным образом альфа-спиралями), поддерживающую глобулярную часть белка (Skehel, 2000). Глобулярная (мембранно-дистальная) часть HA содержит рецептор-связывающие домены (3 по количеству мономеров) и антигенные сайты (Skehel, 2000). Основа рецептор-связывающего сайта каждого мономера консервативна и формируется аминокислотами Tyr-98, Trp-153, His-183, Tyr-195. Края домена формируются тремя консервативными элементами вторичной структуры белка: 130-петлей (аминокислоты 133-138), 190- α-спиралью (189-199) и 220-петлей (220-229) (Wiley, 1987).

Антигенные сайты или антигенные детерминанты – это участки мембранно-дистальной глобулярной части гемагглютинаина, окружающие рецептор-связывающий домен и взаимодействующие с антителами. Антигенные сайты представляют собой наиболее переменные эпитопы HA, аккумуляция замен в которых обычно приводит к изменению антигенных свойств вируса (Shih, 2007; Smith, 2004).

Впервые антигенные сайты были определены для гемагглютинина H3 вируса гриппа А – A/ Hong Kong/1/1968 (Skehel, 1984; Wiley, 1981). Методом антигенного картирования в структуре гемагглютинина гриппа А было показано наличие пяти сайтов связывания антител: А, В, С, D и Е. Сайт А представляет собой петлю, состоящую из аминокислотных остатков 140-145 (нумерация по гемагглютинину H3) и выступающую над поверхностью глобулярной части белка. Сайт В формируется аминокислотами 155-164 и 187-196, входящими в состав  $\alpha$ -спирали. Сайт С локализован на границе «стебля» и «головы» гемагглютинина и представляет собой выступ, сформированный аминокислотами 53, 54, 275, 276, 278. Сайт D образован аминокислотами 172–174, 201-220, 242, 244 и расположен в зоне контакта мономеров тримера HA. Сайт Е включает в себя аминокислоты 63–83 и располагается на боковой поверхности глобулы HA. В дальнейшем, спектр антигенно-значимых позиций был расширен и конкретизирован (как за счет методов антигенного картирования, так и посредством методов биоинформатики) (Bush, 1999; Smith, 2004; Lees, 2010; Каверин, 2012):

А - 122, 124, 126, 130–133, 135, 137, 138, 140, 142–146, 150, 152, 168

В - 128, 129, 155–160, 163–165, 186–190, 192–194, 196–198

С - 44–48, 50, 51, 53, 54, 273, 275, 276, 278–280, 294, 297, 299, 300, 304, 305, 307–312

D - 96, 102, 103, 117, 121, 167, 170–177, 179, 182, 201, 203, 207–209, 212–219, 226–230, 238, 240, 242, 244, 246–248

Е - 57, 59, 62, 63, 67, 75, 78, 80–83, 86–88, 91, 92, 94, 109, 260–262, 265

В гемагглютинине вируса гриппа типа В на модельном штамме В/Hong Kong/8/73 было обнаружено (Wang, 2008) несколько областей, аминокислотные замены в которых влияют на изменение антигенных свойств HA. Это 120-петля (аминокислоты 116-137 субъединицы HA1), 150-петля (141-150), 160-петля (162-167) и 190-спираль (194-202). 120-петля гриппа В частично совпадает с антигенным сайтом Е гемагглютинина H3 вируса гриппа А и является одним из наиболее вариабельных участков HA (Verhoeven, 1983). В частности, методами обратной генетики было показано, что аминокислотные замены в положениях 129 и 137 субъединицы HA1 вирусов гриппа типа В генетической линии В/Victoria приводят к изменениям антигенных свойств (Lugovtsev, 2007). Участок 150-петли отличается значительной протяженностью и отстоит от глобулы белка примерно на 9 Å. Относительно вирусов гриппа типа А этот участок частично соответствует антигенному сайту А гемагглютинина H3. 160-петля представляет собой единственный участок HA, в котором у природных изолятов вируса гриппа В неоднократно обнаруживались инсерции и делеции (McCullers, 1999) (Nerome, 1998). Различные паттерны инсерций и делеций на участке 160-петли, вероятно, обуславливают эффективность изменения антигенных свойств вирусов гриппа типа В, что позволяет им долгое время циркулировать без антигенных шифтов (в отличие от вирусов гриппа А) (Nerome, 1998).



160-петля частично соответствует антигенному сайту В гемагглютинаина Н3 вирусов гриппа А. 190-петля играет важную роль в формировании антигенных характеристик вируса. В частности на этом участке НА была обнаружена аминокислотная замена А196Т, обусловившая возникновение потенциального сайта гликозилирования и, по видимому, оказавшая влияние на развитие эпидемии гриппа в течение эпидемического сезона 2002-2003 гг. (Nakagawa, 2004). Участок 190-петли частично соответствует антигенному сайту В в структуре НА Н3 вируса гриппа А.

Нейраминидаза является поверхностным гликопротеином II типа, у которого незаряженные аминокислоты располагаются на N-конце и выполняют как функцию сигнальной последовательности, так и якорной последовательности (Colman, 1985).

Молекула NA представляет собой тетрамер (молекулярная масса около 240 кДа), состоящий из одинаковых субъединиц (470 аминокислот каждая) и формой напоминающий гриб (Рис. 8).

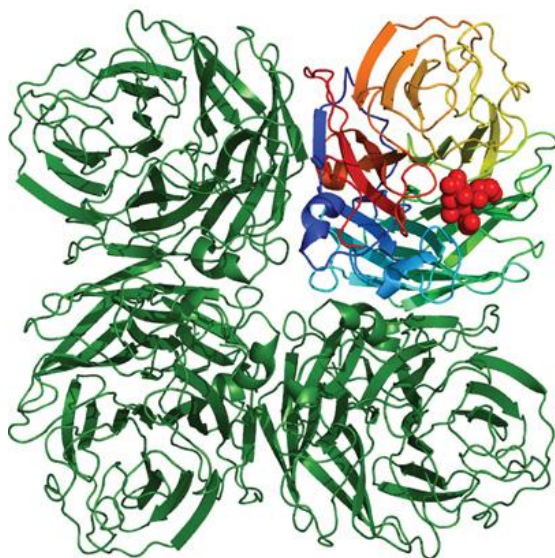


Рисунок 8. Структура NA вируса гриппа. Зеленым цветом окрашены три из четырех мономеров. «Лопастии пропеллера» четвертого мономера окрашены в разные цвета. Красными сферами обозначен активный центр фермента. (Gamblin and Skehel. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins)

«Ножка» гриба состоит из примерно 75 первых аминокислотных остатков и соединяет с поверхностью вириона «голову», несущую активный центр. Структура «головы» тетрамера была определена кристаллографически (Colman, 1985; Gamblin, 2010) Каждая субъединица, принимающая участие в формировании «шляпки» гриба, представляет собой структуру, напоминающую шестилопастной пропеллер, образованный четырьмя антипараллельными β-цепями. На мембранно-дистальной поверхности β-пропеллера NA, примерно в его центре, расположен активный центр фермента (Colman, 1983; Varghese, 1983; Burmeister, 1992).

Кристаллографически было показано, что активный сайт фермента расположен в кармане (Рис. 9), образованном аминокислотными остатками, инвариантными для вирусов гриппа типов А и В (Varghese, 1983; Burmeister, 1992). Непосредственно зону контакта с сиаловыми кислотами образуют т.н. каталитические аминокислотные остатки: Arg-118, Asp-151, Arg-152, Arg-224, Glu-276, Arg-292, Arg-371 и Тир-406. Кроме того, в структуру активного сайта входят остатки, которые выполняют структурную роль и не взаимодействуют непосредственно с сиаловыми кислотами: Glu-119, Arg-156, Trp-178, Ser-179, Asp-198, Ile-222, Glu-227, Glu-277, Asn-294 и Glu-425 (Varghese, 1983; Garman, 2005).

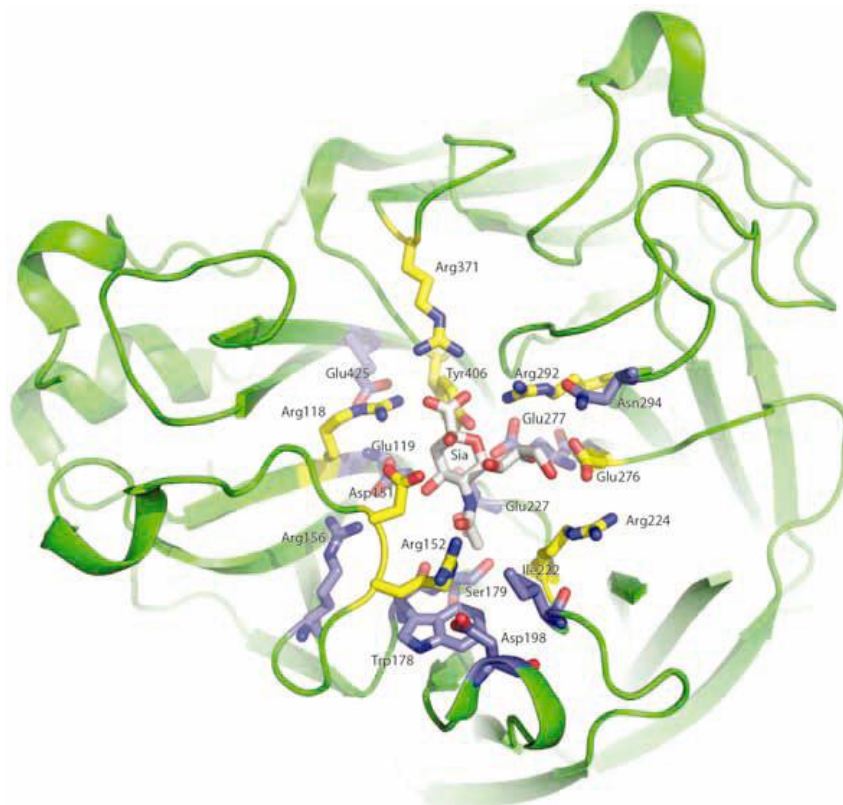


Рисунок 9. Активный центр нейраминидазы. Показана структура на примере одной из четырех субъединиц. Желтым цветом показаны каталитические аминокислотные остатки, синим – структурные, а белым – сиаловая кислота (Rupert J. Russell. Influenza glycoproteins: Hemagglutinin and neuraminidase, 2013)

В структуре NA также выделяют несколько антигенных детерминант. На основе способности связываться с антителами, а также на основе частот аминокислотных замен, были определены 7 потенциальных сайтов взаимодействия NA с антителами: 153, 197-199, 328-336, 339-347, 367-370, 400-403 и 431-434 (Colman, 1983), согласно нумерации N2.

#### 1.5.2 Разнообразие поверхностных гликопротеинов

К настоящему времени у вирусов гриппа птиц (являются основным природным резервуаром вируса гриппа А) были обнаружены 16 антигенно-различных вариантов HA (H1-H16) и 9 вариантов NA (N1-2N9) (рис. 10). Поверхностные гликопротеины вирусов гриппа

образуют по две группы. Идентичность первичных структур НА различных субтипов составит от 40% до 70%, а в пределах отдельных субтипов идентичность составляет от 80% до 100%. НА разных субтипов по первичной структуре идентичны на 50%-70%.

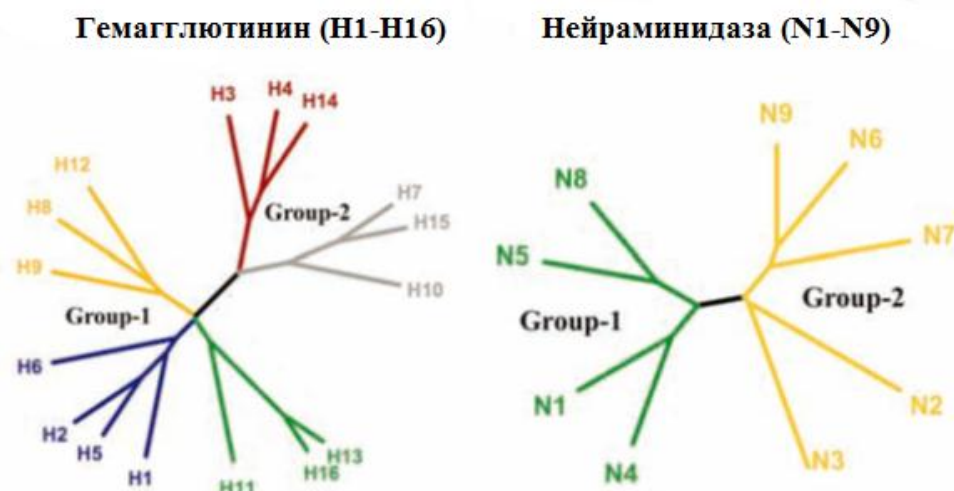


Рисунок 10. Филогенетические дендрограммы, иллюстрирующие разделение НА и NA вирусов гриппа птиц на субтипы и группы (Rupert J. Russell. Influenza glycoproteins: Hemagglutinin and neuraminidase, 2013)

На данный момент H1, H2 и H3, а также N1 и N2 были обнаружены у вирусов гриппа А, вызывающих эпидемии в человеческой популяции. Вирусы гриппа, содержащие H3, H7 и N8, N7 были обнаружены у лошадей, а от свиней были выделены вирусы, характеризующиеся четырьмя субтипами гемагглютинина: H1, H2, H3 и H9 и двумя субтипами нейраминидазы: N1 и N2. Кроме того, у летучих мышей было обнаружено по два новых субтипа НА (H17 и H18) и NA (N10 и N11) (Tong, 2013; Wu, 2014). Вирусы гриппа типа В преимущественно циркулируют в человеческой популяции и формируют отдельную антигенную группу.

### 1.5.3 Функциональность поверхностных гликопротеинов

И гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа взаимодействуют с клеточными рецепторами (Klenk, 1955; Gottschalk, 1958). НА связывается с рецепторами и обеспечивает эндоцитоз вирусных частиц внутрь клетки. В результате действия клеточных протонных насосов рН в эндоцитозных везикулах доводится до 5. В зависимости от субтипа вируса гриппа при рН от 5 до 6,4 НА активирует слияние мембран. Существует предположение, что NA также задействована на этапе эндоцитоза (Matrosovich, 2004), но, судя по всему, действие нейраминидазы в этом процессе не критично, т.к. для успешного слияния мембран достаточно экспрессии только НА.

NA необходима на финальной стадии жизненного цикла вируса, когда она осуществляет отщепление концевых сиаловых кислот от гликопротеинов и гликолипидов, обеспечивая высвобождение вновь синтезированных вирусных частиц от поверхности клетки (Palese, 1974)

Согласно результатам изучения вирусного генома, поверхностные гликопротеины вирусов гриппа человека произошли от вирусов, циркулировавших среди птиц и свиней (Webster, 1992) и, при этом, межвидовая трансмиссия сопровождалась изменениями специфичности связывания НА с клеточными рецепторами, а также с изменениями процесса НА-опосредованного высвобождения новых вирусных частиц от клетки (Rogers, 1983).

Способность НА связываться с сиаловыми кислотами клеточных рецепторов является видоспецифичной (Rogers, 1983). Соответствующие рецепторы представлены двумя типами, отличающимися расположением гликозидной связи между сиаловой кислотой и галактозой:  $\alpha 2,3$  (SA $\alpha 2,3$ Gal) и  $\alpha 2,6$  (SA $\alpha 2,6$ Gal). Вирусы гриппа птиц и лошадей преимущественно связываются сиаловыми кислотами, характеризующимися  $\alpha 2,3$ -гликозидной связью с галактозой (SA $\alpha 2,3$ Gal) (Rogers, 1983; Connor, 1994), вирусы гриппа человека – с SA $\alpha 2,6$ Gal рецепторами, а вирусы, циркулирующие среди свиней, связываются как с первым типом рецепторов, так и со вторым (Ito, 1998; Shichinohe, 2013). Разные типы рецепторов отличаются не только видовой принадлежностью, но и локализацией в организме, что обуславливает различное протекание инфекции у млекопитающих и птиц. С помощью микроскопических методов исследования с использованием специфических лектинов в качестве меток (лектин *Sambucus nigra* связывается с  $\alpha 2,6$ -рецепторами, а лектин *Maackia amurensis* - с  $\alpha 2,3$ -рецепторами) было показано, что вирусы гриппа, циркулирующие в человеческой популяции преимущественно взаимодействуют с клетками реснитчатого эпителия респираторного тракта, а вирусы гриппа птиц – с бокаловидными клетками эпителия кишечника (Baum, 1990; Shinya, 2006; Matrosovich, 2004).

Известно, что три пандемических варианта вируса гриппа, циркулировавших в человеческой популяции в 1918 (H1), 1957 (H2) и в 1968 (H3) гг., произошли от птичьих вирусов гриппа (Webster, 1992). Т.к. вирусы гриппа птиц и вирусы гриппа человека связываются с разными типами рецепторов (Rogers, 1983), то для успешной межвидовой трансмиссии было необходимо изменение свойств НА вирусов гриппа птиц. Показано, что эти изменения связаны с аминокислотными заменами в рецептор-связывающем сайте НА. Мутации различны у H1, H2 и H3 (Matrosovich, 2000; Stevens, 2004). В H1 вируса гриппа были обнаружены аминокислотные замены S138A, E190D и G225D, связанные с межвидовой передачей вируса. Для вирусов гриппа, несущих гемагглютинины H2 и H3, межвидовая передача была обусловлена мутациями Q226L и G228S.

#### 1.5.4 Гликозилирование поверхностных гликопротеинов

Гликозилирование белков – это процесс котрансляционной и пост-трансляционной модификации, заключающийся в присоединении углеводных остатков к полипептидной цепи (Varki, 2009). Присоединение боковых углеводных цепей обуславливает изменение

функциональности, а также антигенных свойств НА и, вероятно, может оказывать схожее воздействие на НА. На связывание вируса с клеточными рецепторами оказывают влияние количество и расположение (посредством стерических изменений) боковых углеводных цепей на мембранно-дистальном конце НА, присоединенных в результате N-гликозилирования (осуществляется по аспарагину, расположенному через один аминокислотный остаток от триптофана) (Deom, 1986; Williams, 1993; Günther, 1993; Matrosovich, 1997; Ohuchi, 1997). Кроме того, значение имеет и структура присоединенных олигосахаридов, зависящая от клеток, в которых реплицируется вирус (Crecelius, 1984; Aytay, 1991; Mir-Shekari, 1997).

Влияние гликозилирования на связывание НА с клеточными рецепторами было описано при изучении свойств штамма вируса гриппа типа А субтипа H1N1. Этот штамм изначально был изолирован от человека, адаптирован к мышам для получения варианта, содержащего замену в положении 131 НА1 (что привело к потере сайта гликозилирования), и затем реплицирован в культуре клеток MDCK и в куриных эмбрионах (Gambaryan, 1998). Было показано, что гликозилирование по положению 131 НА коррелировало с нарушением связывания вируса с синтетическими аналогами  $\alpha 2,6$ -рецепторов, но не оказывало выраженного влияния на связывание с  $\alpha 2,3$ -рецепторами. Вероятно, это обусловлено стерическими различиями в структуре комплексов НА с разными типами рецепторов. Таким образом, появление потенциального сайта гликозилирования может обусловить присоединение к полипептиду НА боковой олигосахаридной цепи, которая изменит пространственную структуру НА и окажет влияние на взаимодействие с рецепторами.

Кроме того, что гликозилирование может вносить изменения в процесс связывания с клеточными рецепторами – оно также может влиять на взаимодействие НА с антителами. Во время циркуляции пандемического варианта вируса гриппа А H3N2 (с 1968 г.) в рецептор-связывающем суб-домене и в суб-домене вестигальной эстеразы НА вирусов гриппа накопилось 4 дополнительных сайта гликозилирования. Было показано, что гликозилирование по одному из этих сайтов (при аминокислотной замене D63N) приводит к нарушению связывания с антителами, а ингибирование гликозилирования по этому положению снова позволяет антителам связывать НА (Skehel, 1984). Аналогичные результаты были получены при удалении сайтов гликозилирования посредством сайт-направленного мутагенеза (Abe, 2004).

Для НА вирусов гриппа также было показано влияние гликозилирования на функциональность белка. В частности, удаление консервативного сайта гликозилирования N146 (нумерация по N2) приводит к проявлению нейровирулентных свойств вируса в экспериментах на мышах и возрастанию ферментативной активности НА (Li, 1993.). Для вируса гриппа A/duck/Ukraine/63 с нейраминидазой N8 показано наличие 3 потенциальных сайтов гликозилирования в этом белке: в положениях 84, 144 и 398 (Saito, 1993). Удаление сайтов

гликозилирования в положениях 84 и 398 приводит к нарушениям в созревании белка, а удаление сайта в положении 144 – к изменению ферментативной активности по отношению к различным субстратам (Saito, 1997.).

### **1.6. Изменчивость вируса гриппа**

Можно выделить три механизма изменчивости вируса гриппа – антигенный дрейф (посредством накопления мутаций), антигенный шифт (посредством реассортации) и рекомбинация.

Рекомбинация как механизм изменчивости вируса гриппа подразделяется на негомологичную и гомологичную. Негомологичная рекомбинация происходит между разными сегментами РНК вируса гриппа. Так, считается, что в результате негомологичной рекомбинации между сегментами НА и NP низкопатогенного птичьего вируса гриппа H7N3 в 2002 году в Чили возник высокопатогенный вариант вируса (Suarez, 2004) Позже, в Британской Колумбии также был обнаружен вариант вируса гриппа А(H7N3), возникший в результате негомологичной рекомбинации. Исследования *in vitro* на куриных эмбрионах показали наличие негомологичной рекомбинации, зачастую обуславливающей повышение вирулентности вируса гриппа (Khatchikian, 1989; Orlich, 1994). Гомологичная рекомбинация сегментов генома вируса гриппа (рекомбинация между одинаковыми сегментами различных вариантов вируса) на данный момент не доказана однозначно (Chare, 2003). Но существуют исследования, позволяющие предположить наличие этого механизма изменчивости вируса гриппа. В Китае от павших кур были выделены три изолята вируса гриппа H9N2, которые были дифференцированы методом бляшек. После определения первичных последовательностей всех сегментов генома вируса, было показано, что все гены PA всех трех изолятов мозаичны и произошли от вирусов H9N2 и H5N1 (He, 2009).

Возможность возникновения антигенного шифта обеспечивается сегментированным геномом вируса гриппа. Антигенный шифт представляет собой частный случай реассортации и характеризуется формированием нового варианта вируса гриппа с новой комбинацией поверхностных гликопротеинов (Mc Hardy, 2009). Новый вариант вируса формируется в результате реассортации сегментов генома двух «родительских» вирусов при ко-инфекции в одном организме-хозяине. Теоретически, при реассортации двух вирусов гриппа возможно возникновение  $256 (2^8)$  комбинаций. При антигенном шифте, популяция в которой начинает циркулировать сформировавшийся в результате антигенного шифта вирус, оказывается иммунно наивной к его антигенам, что зачастую вызывает тяжелые эпидемии и пандемии.

Птицы, как природный резервуар вируса гриппа – предоставляют этому патогену неограниченные возможности для изменчивости посредством антигенного шифта. Часто одна птица оказывается инфицирована несколькими вирусами гриппа, что создает условия для

реассортации и, как следствие, генерации новых вариантов вируса гриппа, потенциально способных к преодолению межвидового барьера передачи патогена (Morens, 2009).

Иногда, в результате реассортации между вирусами гриппа, возможен переход генетического материала вируса гриппа птиц к вирусу гриппа, циркулирующему в человеческой популяции. На данный момент известно всего о трех, вызвавших пандемии в человеческой популяции, субтипах гемагглютинина (Н1, Н2 и Н3) из 16 известных у птиц.

Т.к. свиньи могут быть инфицированы как птичьими вирусами гриппа, так и человеческими – именно их было предложено считать промежуточными хозяевами, в которых наиболее вероятно реассортация (и, следовательно, антигенный сдвиг) вируса гриппа с последующей циркуляцией в человеческой популяции (Ludwig, 1995).

Наиболее заметно проявляется антигенный сдвиг при возникновении пандемий гриппа. В прошедшем 20 веке исследователи выделяют несколько пандемий гриппа – в 1918 году («испанский грипп» Н1Н1), в 1957 году («азиатский грипп» Н2Н2), в 1968 году («гонконгский грипп» Н3Н2) и в 1977 году («русский грипп» Н1Н1) (Taubenberger, 2009). В 21 веке пока была только одна пандемия – в 2009 году в человеческой популяции начал циркулировать новый вариант вируса гриппа Н1Н1.

Две пандемии гриппа типа А в 20-м веке: 1957 (субтип Н2Н2) и 1968 (субтип Н3Н2) (Lindstrom, 2004), а также пандемия 2009 г. возникли в результате реассортации между вирусами гриппа А, циркулировавшими в человеческой популяции и в популяциях других видов-хозяев. Показано, что сегменты генома НА, NA и PB1 пандемического вируса гриппа Н2Н2 1957 г. и НА с PB1 пандемического вируса Н3Н2 1968 г. произошли от птичьих вирусов гриппа, а остальные сегменты генома, вероятно, произошли от пандемического вируса гриппа 1918 г. (Reid, 2003).

С другой стороны, точно не известно происхождение «испанского гриппа» Н1Н1 1918 г. вызвавшего на данный момент наиболее значительную и разрушительную пандемию. Возможно, в случае с «испанским гриппом» произошел прямой переход вируса от птиц к человеку в результате реассортации, но более вероятно, что попаданию вируса в человеческую популяцию предшествовала циркуляция в популяции промежуточных хозяев (свиньи) (Smith, 2009).

В 2009 году произошла первая пандемия вируса гриппа в 21 веке – в марте и апреле в Мексике начали регистрироваться случаи заболевания людей новым вариантом вируса гриппа А (Н1Н1), который перешел в человеческую популяцию от свиней (Perez-Padilla, 2009; Garten, 2009). Этот новый вариант вируса гриппа является ярким примером изменчивости в результате антигенного сдвига. Пандемический вирус гриппа Н1Н1pdm09 характеризуется такой комбинацией сегментов генома, которая ранее не встречалась не только у вирусов,

циркулировавших среди людей, но и у вирусов, циркулировавших среди свиней. Сегменты NA и M принадлежат к Евразийской линии свиных вирусов гриппа (попали от птиц в популяцию свиней в 1979 году). Сегменты NA, NP и NS принадлежат к классическим свиным вирусам гриппа, циркулирующим среди свиней с 1918 года. PB2 и PA – принадлежат тройным реассортантам вирусов гриппа свиней (имеют птичье происхождение и перешли к свиньям в 1998 году). Сегмент генома PB1 характерен для тройных реассортантов свиных вирусов гриппа, к которым попал от вируса гриппа человека в 1998 (к человеку этот вариант PB1 попал от птичьего вируса гриппа в 1968 году) (Garten, 2009). Тот факт, что все сегменты генома пандемического вируса 2009 года произошли от свиных вирусов гриппа, позволяет предположить, что новый вариант вируса, сформировавшийся в результате антигенного шифта, мог какое-то время циркулировать в популяциях свиней, оставаясь незамеченным и только потом попасть в человеческую популяцию.

Вирусы гриппа, вызвавшие пандемии – являются наиболее значительными примерами результатов антигенного шифта. Но антигенный шифт не всегда приводит к появлению пандемических вариантов вируса – большая часть новых вариантов остается неизвестной для исследователей, какие-то вирусы обнаруживаются в результате рутинного мониторинга за вирусом гриппа у разных хозяев, а часть вирусов меняют свои характеристики и приобретают возможность преодолевать межвидовой барьер, вызывая локальные вспышки заболеваемости. Так, хотя вспышки высокопатогенного вируса птичьего гриппа H5N1 среди домашней птицы известны с 1959 года (Alexander, 2007), только в 1997 году был обнаружен вариант высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1, способный преодолевать межвидовой барьер и инфицировать людей. Кодированные внутренние белки этого вируса сегменты генома принадлежали к вирусу гриппа H9N2, выделенному от перепелов, а ген нейраминидазы был обнаружен в вирусе гриппа H6N1, выделенном от чирков (Webster, 2006). С 1997 года постоянно обнаруживаются новые варианты гриппа H5N1, в которых показана реассортация для всех сегментов, кроме NA, который остается неизменным (за исключением антигенного дрейфа).

Антигенный дрейф представляет собой изменение антигенных характеристик вируса гриппа, обусловленное постепенным накоплением мутаций в поверхностных гликопротеинах (гемагглютинине и нейраминидазе), в результате чего происходит отклонение вируса от иммунного ответа организма-хозяина. (Treanor, 2004). Одна из причин высокой изменчивости вируса гриппа связана с РНК-зависимой РНК-полимеразой: этот фермент совершает ошибки в процессе репликации, а у вируса гриппа и в клетках млекопитающих нет механизмов для их исправления. В целом, вирус гриппа обладает высоким уровнем генетической изменчивости (Chen, 2006), но именно поверхностные гликопротеины изменяются наиболее динамично, т.к.



подвергаются селективному прессингу со стороны нейтрализующих антител организма-хозяина (Webster, 1992). Изменчивость поверхностных гликопротеинов, приводит к тому, что те вирусы гриппа, которые не нейтрализуются или слабее нейтрализуются антителами хозяина, сохраняются естественным отбором как более приспособленные (Treanor, 2004).

Гемагглютинин как основной антиген вируса гриппа характеризуется более высоким, чем в случае нейраминидазы, темпом изменчивости. При этом большая часть мутаций в НА, которые можно отнести к антигенному дрейфу, происходит по ограниченному числу позиций, расположенных в антигенных сайтах.

Примечательно, что процесс антигенного дрейфа в основном более выражен у вируса гриппа человека (вероятно, не только по причине выраженного иммунного ответа, но также из-за вакцинации населения), менее выражен у вируса гриппа свиней и лошадей, и наименее заметен у вируса гриппа птиц (Gorman, 1992; Ghendon, 1994; de Jong, 1999; Manuguerra, 2000;).

### **1.7. Изменения в первичной структуре НА и NA вирусов гриппа А(Н3N2) и В с 2008 по 2013 гг.**

#### *Эпидемический сезон 2008-2009*

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в эпидемический сезон 2008-2009 гг. в мире, в зависимости от географического региона, преобладали различные варианты вируса гриппа. В частности, в Японии преимущественно выделялся вирус гриппа А(Н3N2), в США и в странах Азии (например: в Корее) – А(Н1N1), в Канаде – вирус гриппа В. Аминокислотные последовательности НА вирусов гриппа А/Н3N2, циркулировавших в мире в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг., характеризовались наличием замен G50E и K140I, ранее описанных для штаммов эпидемического сезона 2007-2008 (в том числе и для вакцинного штамма А/Brisbane/10/2007) гг. и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма А/Wisconsin/67/2005 (WHO, 2008; Baek, 2009).

По данным ВОЗ последовательности НА штаммов, изолированных в начале сезона, характеризовались гомогенностью - не подразделялись на подгруппы. А для последовательностей NA было характерно разделение по наличию замен P386H и I464L относительно штамма А/Brisbane/10/2007. Во второй же половине эпидемического сезона уже изолировались штаммы, по структуре поверхностных гликопротеинов отличавшиеся от более ранних.

Для первичной структуры НА штаммов вируса гриппа В линии В/Victoria в эпидемический сезон 2008-2009 гг. были характерны аминокислотные замены N75K, V146I, N165K и N172P относительно предыдущего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004 (WHO, 2009). Эти замены являются маркерами В/Brisbane/60/2008-подобных штаммов вируса гриппа.

Для нейраминидазы штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, циркулировавших в мире в эпидемический сезон 2008-2009 гг., характерны ключевые аминокислотные замены K125N, I204V, N220K, E320D, D329N, A358E и E404K (WHO, 2009).

#### **Эпидемический сезон 2009-2010.**

По данным ВОЗ (WHO, 2010) в эпидемическом сезоне 2009-2010 гг. в мире доминировал пандемический вирус гриппа А(H1N1) pdm09, на который приходилось 99% изолированных штаммов (оставшийся 1% составляли штаммы вирусов гриппа А(H3N2), сезонного А(H1N1) и В).

Вирусы гриппа А(H3N2), изолированные в эпидемический сезон 2009-2010 гг., разделились примерно поровну на генетические клады Perth/16 и Victoria/208 (WHO, 2010). Для обеих клад характерны аминокислотные замены K158N и N189K относительно штамма А/Brisbane/10/2007. Принадлежность штаммов по структуре НА к генетической кладе Perth/16 определялась заменами E62K и N144K, а к генетической кладе Victoria/208 - заменой T212A.

Разделение вирусов на подгруппы обуславливалось ключевыми аминокислотными заменами в НА:

- T48A, K92R и N312S; S45N; D53N, I230V и E280A – замены, ключевые для трех генетических подгрупп в пределах клады Victoria/208;

- I230V; P162Q; I260M и R261Q – замены, ключевые для трех генетических подгрупп в пределах клады Perth/16.

По аминокислотной последовательности НА изоляты вируса гриппа А(H3N2), выделенные в эпидемический сезон 2009-2010 гг., также были представлены (исходя из наличия ключевых аминокислотных замен D147N и I215V) двумя генетическими кладами: А/Victoria/208 и А/Perth/16. В пределах генетических клад дифференциация на группы обуславливалась наличием аминокислотных замен:

- D127N, I307M, L338F и N342D для генетической группы 1 в составе клады А/Perth/16.

- S367N, K369T и I464L

- L81P и N402D

Вирусы гриппа типа В, изолированные в эпидемический сезон 2009-2010, принадлежали к генетическим линиям В/Victoria и В/Yamagata.

Согласно молекулярно-генетическому анализу вирусы гриппа линии В/Victoria по структуре НА принадлежали к генетической кладе Brisbane/60. К маркерам клады Brisbane/60 относятся аминокислотные замены N75K, N165K и S172P. Разделение на несколько подгрупп в пределах клады Brisbane/60 обусловлено наличием аминокислотных замен в положениях 58, 146, 197, 202 и 225 гемагглютинаина (L58P, V146I, N197D, A202V, V225I). Дифференциация на подгруппы указывает на наличие дрейфа относительно вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008.

По структуре NA циркулировавшие в сезон 2009-2010 гг. вирусы гриппа типа В линии В/Victoria представляли собой В/Brisbane/60/2008-подобные штаммы, исходя из наличия соответствующих маркеров: замен I204V, N220K, E320D, D329N, A358E и E404K. Согласно наличию аминокислотных замен в NA, обуславливающих дифференциацию штаммов внутри клады Brisbane/60 на подгруппы можно сделать вывод о дрейфе циркулировавших в эпидемический сезон 2009-2010 гг. вирусов гриппа относительно вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008.

Циркулировавшие в эпидемический сезон 2009-2010 гг. вирусы гриппа генетической линии В/Yamagata по первичной структуре белка HA относились к генетической кладе Bangladesh/3333, характеризующейся маркерными заменами S150I, N165Y и G229D. Кроме того, вирусы гриппа В изолированные в эпидемический сезон 2009-2010 гг. содержали замены N202S и M251V, обуславливающие разделение вирусов на генетические подгруппы в пределах клады Bangladesh/3333.

По структуре NA циркулировавшие в сезон 2009-2010 гг. вирусы гриппа типа В линии В/Yamagata представляли собой В/Bangladesh/3333/2007-подобные штаммы, исходя из наличия соответствующих ключевых аминокислотных замен Q42R, N125K, K186R, D463N и A465T.

В целом, исходя из филогенетических дендрограмм, представленных в отчете ВОЗ по сезону 2009-2010 гг. можно заключить, что хотя присутствовал генетический дрейф штаммов вируса гриппа В в пределах генетических клад – он был незначительным.

#### **Эпидемический сезон 2010-2011**

В течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. в мире преобладал вирус гриппа А(H1N1) pdm09, но в отличие от предыдущего эпидемического сезона – возросла доля вирусов гриппа А(H3N2) и В (грипп В превалировал над гриппом А(H3N2)).

Вирусы гриппа А(H3N2), циркулировавшие в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг., по структуре HA принадлежали к двум генетическим кладам: Perth/16 и Victoria/208, с последующей дифференциацией на подгруппы в пределах этих клад (WHO, 2011).

Вирусы, относившиеся к кладе Perth/16 разделялись на две подгруппы в зависимости от наличия ключевых аминокислотных замен в HA:

- P162S, I260M и R261Q, а также дополнительные (в нескольких штаммах) замены E50K или N81D.

- N133D, R142G и V213A.

Вирусы гриппа клады Victoria/208 на основании наличия маркерных замен подразделялись на несколько подгрупп:

- V223I и N145S, а также дополнительные замены (в отдельных подгруппах) N144D, A198S (часто ассоциирована с S45N), T48I и N312S, V323I.

- N312S с характерными для некоторых штаммов заменами T48A и K92R;
- S45N
- D53N, Y94H, I230V и E280A с дополнительными, обуславливающими принадлежность к отдельным подгруппам, аминокислотными заменами I192T или же S199A (иногда ассоциирована с S45N).

Исходя из первичной структуры NA, вирусы гриппа A(H3N2), циркулировавшие в мире в эпидемический сезон 2010-2011 гг. подразделялись на генетические клады Perth/16 и Victoria/208. Согласно филогенетическому исследованию (WHO, 2011), в пределах генетических клад происходила дифференциация на подгруппы (по наличию общих аминокислотных замен), что свидетельствует о дрейфе относительно ранее циркулировавших вариантов вируса гриппа A(H3N2). Так, из генетической клады Perth/16 по маркерным заменам D127N, I307M, L338F и N342D была выделена отдельная подгруппа. В кладе Victoria/208, согласно филогенетической дендрограмме, также было выделено несколько генетических подгрупп.

Ближе к концу эпидемического сезона 2010-2011 гг. в мире среди вирусов гриппа A(H3N2) уже преобладали штаммы, относившиеся к генетической кладе Victoria/208 (WHO, 2011).

В течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. циркулировавшие вирусы гриппа типа В принадлежали к генетическим линиям В/Victoria и В/Yamagata, с преобладанием вирусов линии В/Victoria.

В основном, изоляты вируса гриппа В линии В/Victoria, выделенные в мире в эпидемический сезон 2010-2011 гг., по структуре NA относились к генетической кладе 1 «Brisbane/60» (согласно наличию маркерных аминокислотных замен N75K, N165K и S172P). В пределах клады Brisbane/60 вирусы подразделялись на две основные филогенетические группы, характеризующиеся наличием замен V146I в одном случае и L58P – в другом. Но кроме вируса гриппа В клады Brisbane/60 в сезон 2010-2011 гг. в незначительном количестве обнаруживались варианты вируса, близкородственные предыдущему вакцинному штамму В/Malaysia/2506/2004 и относящиеся к следующим генетическим кладам:

- Клада 4 (с аминокислотной заменой K136R);
- Клада 5 «Far East» (замена T37I);
- Клада 6 «South American» (с характерными заменами K167R и T182K).

По первичной структуре NA большинство циркулировавших в мире штаммов принадлежали к генетической кладе 1 «Brisbane/60» (характеризуется комбинацией аминокислотных замен P41S, K125N, E320D, E404K, N463D, I204V, N220K и A358E). Кроме того, как и в случае с NA, меньшая часть выделенных изолятов вируса гриппа В относилась к

нескольким подгруппам, филогенетически более близким к предыдущему вакцинному штамму B/Malaysia/2506/2004:

- Клада 5 «Far East» (с характерной аминокислотной заменой T8M);
- Клада 6 «South America» (замены A26V, S41L, A55V, V71T, T106I и D342N);
- Клада, состоящая из вирусов гриппа, которые по структуре НА включены в кладу Brisbane/60, а по структуре НА–филогенетически дистанцированы от нее.

В целом, для вирусов гриппа В генетической линии B/Victoria, циркулировавших в мире в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. характерна более выраженная изменчивость нейраминидазы, чем гемагглютанина – именно в нейраминидазе происходило большее число аминокислотных замен. Кроме того, можно отметить случаи реассортации – некоторые выделенные штаммы по структуре НА и NA принадлежали к разным генетическим кладам.

Штаммы вируса гриппа В генетической линии B/Yamagata, циркулировавших в мире в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг., в большинстве, содержали маркерные аминокислотные замены S150I, N165Y, G229D в НА и принадлежали к генетической кладе B/Bangladesh/3333/2007. Незначительная часть выделенных изолятов, содержащих в структуре НА аминокислотные замены R48K, P108A и T181A, относилась к генетической кладе 2 «Brisbane/3».

По структуре НА штаммы гриппа В генетической линии B/Yamagata, выделенные в эпидемический сезон 2010-2011 гг., за незначительным исключением также принадлежали к генетической кладе B/Bangladesh/3333/2007 и содержали ключевые аминокислотные замены Q42R, D463N и A465T. Часть исследованных ВОЗ штаммов относилась к генетической кладе 2 «Brisbane/3» и содержала маркерные аминокислотные замены I248V, T106I и S295R.

#### **Эпидемический сезон 2011-2012 гг.**

В эпидемическом сезоне 2011-2012 гг. преобладающим субтипом вируса гриппа был А(Н3N2) (в отличие от предыдущего сезона, когда преобладал субтип А(Н1N1)). Доля вируса гриппа типа В в общем пуле была меньше, чем в предыдущий сезон – он обнаруживался реже, чем А(Н3N2), но все же чаще чем А(Н1N1).

По структуре НА ВОЗ подразделяет вирусы гриппа А(Н3N2) эпидемического сезона 2011-2012 гг. на две генетические клады: Perth/16 и Victoria/208. В пределах клад, согласно наличию ключевых аминокислотных замен, было выделено 7 генетических групп (кроме того, группа 3 клады Victoria/208 была разделена на 3 подгруппы):

В кладе Perth/16:

(1) P162S, I260M, R261Q;

(2) N133D, R142G, T212A, V213A, N169K & V176I;

В кладе Victoria/208:

- (3A) N144D, N145S, V223I и D158N;
- (3B) N145S, A198S, V223I, N312S и D158N;
- (3C) S45N, T48I, A198S, V223I и N312S;
- (4) N312S;
- (5) D53N, Y94H, I230V и E280A;
- (6) D53N, Y94H, S199A, I230V и E280A;
- (7) S45N.

По структуре NA штаммы вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавшие в мире в эпидемический сезон 2011-2012 гг. принадлежали в генетическим кладам Perth/16 и Victoria/208 и, аналогично классификации на основе структуры HA, подразделялись на 7 генетических групп. В пределах группы 3 клады Victoria/208 также выделялись три подгруппы – 3А, 3В, 3С.

Большинство выделенных в мире в целом штаммов вируса гриппа А(Н3N2) принадлежали генетическим группам 3, 5 и 6 клады Victoria/208 (WHO, 2012).

В эпидемическом сезоне 2011-2012 гг. в мире фиксировалась циркуляция вируса гриппа В обеих известных генетических линий – В/Victoria и В/Yamagata. При этом, в первой половине сезона преобладали штаммы линии В/Yamagata (WHO, 2012), но к концу сезона соотношение генетических линий составило 60% В/Victoria и 40% В/Yamagata (WHO, 2012). В сравнении же с предыдущими эпидемическими сезонами отмечалось возрастание доли вирусов генетической линии В/Yamagata в общем пуле гриппа В.

По структуре HA все изолированные в мире в эпидемический сезон 2011-2012 гг. штаммы вируса гриппа В линии В/Victoria принадлежали к генетической кладе 1 Brisbane/60. Но филогенетически HA большинства исследованных штаммов были дистанцированы от актуального вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 (WHO, 2012), хотя и в меньшей степени, чем в предыдущий эпидемический сезон. Последовательности NA характеризовались более выраженной, чем в случае с HA, вариабельностью. Большинство исследованных ВОЗ штаммов гриппа В генетической линии В/Victoria относились к кладе 1 Brisbane/60, но некоторые штаммы принадлежали к генетическим кладам 3 и 4. В результате, были зафиксированы случаи реассортации, когда по структуре HA штамм принадлежал к кладе 1, а по структуре NA – к кладам 3 или 4 (WHO, 2012).

Штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, циркулировавшие в мире на протяжении эпидемического сезона 2011-2012, как по структуре HA, так и по структуре NA подразделялись на две генетические клады: 2 (Brisbane/3) и 3 (Bangladesh/3333). При этом в первой половине эпидемического сезона преобладали штаммы клады 3, а во второй половине сезона – соотношение приблизилось к 1:1. Вакцинным штаммом на эпидемический сезон 2011-2012 гг. являлся В/Wisconsin/1/2010, относящийся в кладе 3 (Bangladesh/3333). Клада 3

характеризовалась вариабельностью структур HA и подразделялась на несколько дистанцированных друг от друга филогенетических групп (по наличию ключевых аминокислотных замен): группа В/Wisconsin/1/2010 с аминокислотной заменой N202S, группа, определяемая заменой T181K, группа с заменами M251V, T181A и K253R и группа с заменами K253R или V29A и L172Q. По структуре NA клада 3 также подразделялась на 4 подгруппы.

#### **Эпидемический сезон 2012-2013 гг.**

В течение эпидемического сезона 2012-2013 гг. в мире циркулировали вирусы гриппа типа А и типа В, с преобладанием гриппа А. Грипп типа А был представлен субтипами А(Н3N2) и А(Н1N1) pdm09, при этом сложилась ситуация, обратная наблюдаемой в предыдущий эпидемический сезон – вирус гриппа А(Н1N1) pdm09 детектировался чаще, чем А(Н3N2).

Вирусы гриппа А(Н3N2), циркулировавшие в мире в эпидемический сезон 2012-2013 гг. принадлежали к генетической кладе Victoria/208. В пределах этой клады было выделено несколько генетических групп (аналогично предыдущему эпидемическому сезону). В первой половине эпидемического сезона обнаруживались штаммы, по структуре HA и NA относившиеся в большинстве случаев к генетической группе 3 (подгруппы 3A, 3B и 3C), а также к группам 5 и 6. Группы дифференцировались по наличию ключевых аминокислотных замен в HA:

(3A) N144D, N145S, V223I и HA2 D158N;

(3B) N145S, A198S, V223I, N312S и D487N, а также N144D в некоторых последовательностях;

(3C) S45N, T48I, S145N, A198S, V223I и N312S, а также некоторые вирусы содержали замены Q33R и N278K. Кроме того, значительное количество вирусов содержали обратную замену N145S, а также замены T128A и R142G;

(5) K2E, N8D, D53N, Y94H, I230V и E280A;

(6) D53N, Y94H, S199A, I230V и E280A.

Во второй же половине эпидемического сезона наибольшее распространение получили варианты вируса, относившиеся к генетическим подгруппам 3B и 3C группы 3. Кроме того, ранее описанные (в начале эпидемического сезона) филогенетические ветви в пределах подгруппы 3C получили большее распространение и были названы 3C.1, 3C.2 и 3C.3:

(3C.1) Q33R и N278K;

(3C.2) N145S в дополнение к заменам, характерным для 3C.1;

(3C.3) T128A и R142G в дополнение к заменам, характерным для 3C.2.

Появление этих групп коррелировало с генетическим дрейфом в пределах одного эпидемического сезона.

По структуре NA для вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших в эпидемический сезон 2012-2013 гг. в мире в целом была характерна меньшая степень изменчивости, чем в случае с НА.

Среди вирусов гриппа типа В, изолированных по всему миру в эпидемический сезон 2012-2013 гг. преобладали штаммы генетической линии В/Yamagata.

Согласно отчетам ВОЗ, большинство штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata принадлежали к кладе 2 (с референс-штаммами В/Estonia/55669/2011, В/Massachusetts/02/2012 и В/Hong Kong/3577/2012), а меньшая часть – относилась к кладе 3 (с вакцинным штаммом В/Wisconsin/1/2010 и референс-штаммами В/Stockholm/12/2011, В/Serbia/1894/2011 и В/Novosibirsk/1/2012).

### **1.8. Заключение по обзору литературы**

Особенности эпидемиологии гриппа во многом объясняются строением вирусного генома и свойствами вирусных белков. Высокая степень изменчивости генома посредством накопления отдельных мутаций позволяет вирусу уклоняться от специфического иммунитета и, вследствие этого, вызывать ежегодные эпидемии, а сегментированность генома лежит в основе процесса реассортации, который, в результате антигенного шифта, может приводить к появлению новых вариантов вируса, в том числе наиболее опасных для человеческой популяции пандемических штаммов.

Периодический характер эпидемий гриппа обусловлен постоянным отклонением вируса от иммунного прессинга (в том числе вакцинного происхождения) со стороны организма-хозяина, что обеспечивается высокой степенью изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа. Антигенный дрейф оказывает значительное влияние на снижение эффективности вакцинации от гриппа. Совместная циркуляция антигенно различных вариантов создает дополнительные сложности для рекомендаций по составу вакцины (Нау, 2001). Влияние антигенного дрейфа на эффективность вакцинации можно проиллюстрировать примерами. Так, в Европе и США в сезоне 1997 – 1998 гг. были зарегистрированы вспышки тяжелого заболевания, так как новый дрейфовый вариант А/Sydney/05/97 (Н3N2) значительно отличался от вакцинного штамма, и поствакцинальный иммунитет оказался неэффективным. Во время сезона 2003 – 2004 гг. циркулировал штамм А/Fujian/411/2002(Н3N2), в то время как в состав вакцины входил антигенно отличный от него штамм А/Panama/2007/99(Н3N2) (Carrat, 2007). Именно по этой причине необходимы постоянный контроль пула циркулировавших в человеческой популяции вирусов гриппа и ежегодный пересмотр состава вакцины, чтобы обеспечить наибольшее соответствие вакцинных штаммов вирусам, циркулирующим среди населения (WHO, <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>).



Очевидно, что в настоящее время, кроме мониторинга изменчивости вируса гриппа, циркулирующего в человеческой популяции (для отслеживания дрейфовых вариантов вируса, способных уклоняться от иммунного ответа) необходим постоянный надзор за вирусами гриппа, циркулирующими среди различных хозяев. Контроль за вирусом гриппа, циркулирующим среди дикой птицы, необходим для мониторинга за появлением новых вариантов вируса в природном резервуаре, а среди домашней птицы - для отслеживания вируса гриппа, который может инфицировать контактирующих с птицами людей. Кроме того, важен надзор за циркуляцией вируса гриппа в популяциях потенциальных промежуточных хозяев (в первую очередь – свиней) для обнаружения вариантов вируса гриппа, способных инфицировать людей и успешно передаваться от человека к человеку, вызывая эпидемии и пандемии.

Современные методы исследования позволяют не просто осуществлять мониторинг за циркулирующими вариантами вируса гриппа, но и изучать патоген и исследовать взаимодействие между вирусом и организмом-хозяином на различных уровнях организации, оценивать изменения в геноме, приводящие к изменению свойств вируса, и предсказывать их. Кроме того, благодаря обилию механизмов изменчивости и ее динамике – вирус гриппа является удобной моделью для изучения эволюционных процессов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение работ с клиническими образцами одобрено решением этического комитета IRB 00001360 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 2 от 20.05.2008 г.) и решением комитета по биомедицинской этике при ФГБУ НЦ КЭМ СО РАМН (решение №25 от 19.11.2012 г.).

### 2.1 Материалы

#### Реактивы

Бычий сывороточный альбумин (БСА) V фракция 35% (Sigma Aldrich, Германия); гепаринизированная кровь петуха, гуся, морской свинки для приготовления суспензии эритроцитов (питомник лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»); САЖ - стабилизирующий раствор, содержащий 10% сахарозы и 15% желатина (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия); бета-пропиолактон 98%; агароза (Сигма, США), трис-ацетатный буфер ТАЕ (Сигма, США); ДНК- маркер (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Литва).

#### Растворы:

- раствор натрия хлорида 0,9% (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»);
- раствор Хенкса (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»);
- фосфатно-солевой буфер pH=7,2 («БиолоТ», Россия);
- 0,05 % Трипсин-ЭДТА (Gibco, Канада)

#### Среды и сыворотки:

- питательная среда для культур клеток Игла MEM (Gibco, Великобритания);
- сыворотка плодов коров (Gibco, Австралия).

#### Антибактериальные и противогрибковые препараты:

- бензилпенициллина натриевая соль 1000000 ЕД (ОАО «Синтез», Россия);
- стрептомицина сульфат 1 г (ОАО «Синтез», Россия);
- гентамицина сульфат 40 мг/мл (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь);
- амфотерицин В 50000 ЕД (ОАО «Синтез», Россия).

#### Ферменты:

- трипсин ТРСК (Sigma Aldrich, Германия);
- RDE (DenkaSeiken, Япония);

#### Коммерческие наборы:

- набор реагентов для выделения РНК «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия);
- набор реагентов для обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия);

набор реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» («АмплиСенс», Россия);

набор Quick-Load Taq 2X Master Mix (BioLabs, Великобритания);

набор QIAquick Gel Extraction Kit (Quagen, Германия);

набор BigDye Terminator 3.1v Cyclor (Applied Biosystem, США);

набор BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystem, США).

### **Культура клеток**

Культура клеток MDCK (Лондон), получена из ЦЦ ВОЗ по гриппу (CDC, Атланта, США), которая поддерживалась на среде Игла MEM с 10 %-ной сывороткой плодов коров и 50 мкг/мл гентамицина сульфата.

### **Материалы**

Пластиковые пробирки с резьбой и винтовой крышкой 2 мл (Axygen, США); стерильные вязкозные тампоны на пластиковых аппликаторах для сбора мазков из зева и носа (Fisher Scientific); пластиковые пробирки 1,5 мл, 0,5 мл и 0,2 мл (Eppendorf, Германия); пластиковые наконечники объемом 0,5 – 10 мкл, 5 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл (Axygen, США); 2 мл криопробирки (Nunc, Дания); культуральные флаконы 25 см<sup>2</sup>, 75 см<sup>2</sup> (TPP, Швейцария); планшеты MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystem, США).

### **Оборудование**

Бокс биологической безопасности «Ламинар-С» («Ламинарные системы», Россия); CO<sub>2</sub>-инкубатор (Nuair, USA); инвертированный микроскоп (Carl Zeiss, Германия); вортекс (Biosan, Латвия); водяная баня (ELMI Ltd, Латвия); амплификатор «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия); программируемый термостат (амплификатор) Mastercycler gradient AG 2233 (Eppendorf, Германия); генетический анализатор 310 Genetic analyzer (Applied BioSystems, США); центрифуга «MiniSpin» (Eppendorf, Германия); микропланшетный спектрофотометр (Bio Rad, США); механические дозаторы переменного объема (Ленпипет, Россия).

Оборудование, использованное в работе, прошло метрическую поверку в соответствии с действующими правилами и нормативными документами.

## **2.2 Методы**

### **Сбор и хранение мазков из носа и зева**

Сбор мазков из зева и носа от людей с симптомами острой респираторной вирусной инфекции осуществлялся в первые трое суток от начала заболевания стерильными вязкозными тампонами на пластиковых аппликаторах. При взятии материала из носа тампон вводили последовательно в обе ноздри в область нижнего носового хода за пределы преддверия, после чего его погружали в пробирку с транспортной средой (среда для культур клеток Игла MEM с 0,5% бычьего сывороточного альбумина V фракция, 50 мкг/мл гентамицина и 2,5 мкг/мл

амфотерицина В). Мазки из зева собирали аналогичным образом, плотно прижимая тампоны к пораженным гиперемизированным участкам миндалин и задней стенки глотки.

Сбор проб осуществлялся на базе ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии» городов азиатской части РФ (география сбора отражена в названиях штаммов), а также в поликлиниках г. Новосибирска, наукограда Кольцово (Новосибирская область) и пос. Довольное (Новосибирская область).

Транспортировка образцов осуществлялась в сосудах Дьюара с жидким азотом. Собранные образцы хранили до исследования при температуре не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Выделение вируса гриппа из клинических образцов и его идентификация**

#### **Выделение и культивирование в культуре клеток MDCK**

Выделение вируса гриппа из клинических образцов (мазки из зева и носа) производили в культуре клеток MDCK. Для этого рассеивали культуру клеток в культуральные флаконы с площадью поверхности  $12,5\text{ см}^2$  в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл. В качестве ростовой среды использовали питательную среду для культур клеток Игла-МЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки коров и раствора гентамицина сульфата в концентрации 50 мкг/мл. Клетки культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение суток.

Пробирки с образцами (мазки из носа и зева) центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга «MiniSpin», Eppendorf), отбирали надосадочную жидкость, которую использовали для заражения клеток.

Флаконы с суточным монослоем клеток MDCK дважды отмывали раствором Хенкса, после чего исследуемые образцы (по 200 мкл) наносили на монослой клеток. Инфицированные культуры помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор с температурой  $37^{\circ}\text{C}$  и подачей 5%  $\text{CO}_2$  на 30 - 40 мин (для адсорбции вируса), после чего в них вносили поддерживающую среду, которую готовили следующим образом: в питательную среду для культур клеток Игла-МЕМ добавляли 0,2% бычьего сывороточного альбумина V фракции, трипсин ТРСК 2 мкг/мл, гентамицина сульфат 50 мкг/мл, амфотерицин В 2,5 мкг/мл. Затем культуральные флаконы помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор с температурой  $37^{\circ}\text{C}$  и подачей 5%  $\text{CO}_2$ . Ежедневно контролировали под микроскопом состояние монослоя с целью обнаружения признаков цитопатического действия вируса (ЦПД), проявляющегося в разрушении монослоя. При отсутствии выраженного ЦПД пробы выдерживали до 7 сут. При отрицательном результате проводили последовательно 3 пассажа в культуре клеток MDCK с регистрацией репродукции вируса по ЦПД и в реакции гемагглютинации (РГА), как указано ниже. При отрицательных результатах на протяжении трех пассажей исследование материала прекращали.

Хранение вирусосодержащей культуральной жидкости осуществляли при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **Индикация и идентификация вируса гриппа в культуральной жидкости**

### **Реакция гемагглютинации**

Наличие вируса в культуральной жидкости определяли в реакции гемагглютинации (РГА) по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ (Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO, 2011).

### **Приготовление суспензии эритроцитов**

Для постановки РГА использовали эритроциты петуха, гуся, морской свинки и человека группы 0(I)Rh<sup>-</sup>.

Суспензию эритроцитов крови готовили по следующей схеме: взятую с гепарином кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1200 об/мин (центрифуга «MiniSpin», Eppendorf). Супернатант и верхний слой осадка, состоящий из лейкоцитов, удаляли. Эритроциты промывали трижды фосфатно-солевым буфером, ресуспендируя осадок с последующим осаждением эритроцитов в течение 10 мин при 1200 об/мин (центрифуга «MiniSpin», Eppendorf). Определяли объем осадка эритроцитов и разводили его до необходимой концентрации фосфатно-солевым буфером. Конечная концентрация суспензии эритроцитов гуся и петуха составляла 0,5%, а эритроцитов морской свинки и человека группы крови 0(I)Rh<sup>-</sup> – 0,75%.

### **Постановка и учет реакции гемагглютинации**

В V-образном 96-луночном серологическом микропланшете готовили последовательные двукратные разведения тестируемой культуральной жидкости (КЖ) в 0,01М фосфатно-солевом буфере, рН 7,3 - 7,5 (БиолоТ). Конечный объем разведенной КЖ в каждой лунке составлял 50 мкл. К полученным разведениям КЖ добавляли по 50 мкл стандартизированной суспензии эритроцитов. В каждом планшете ставили контроль эритроцитов (50 мкл ФСБ и 50 мкл суспензии эритроцитов).

Смесь перемешивали встряхиванием планшета и инкубировали при 4°C. Учет реакции проводили после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках. О наличии гемагглютинирующих агентов в образце КЖ судили по равномерной седиментации осадка эритроцитов на дне лунки. В этом случае РГА считали положительной (WHO, 2011). Наибольшее разведение КЖ, где РГА все еще была положительна, принимали за конечную точку титрования. При этом количество вируса гриппа, соответствующее конечной точке титрования, принимали за 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ).

### **Изучение антигенных характеристик выделенных штаммов вируса гриппа в реакции торможения гемагглютинации с референс-сыворотками**

Изучение антигенных характеристик выделенных штаммов вируса гриппа проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) согласно рекомендациям ВОЗ (WHO, 2011). Для

этого вирусосодержащую культуральную жидкость разводили таким образом, чтобы в 25 мкл содержалось 4 ГАЕ вируса.

В качестве типоспецифических сывороток использовали панель референс-антисывороток (WHO, Reference antisera and antigens to the HA of influenza A and B viruses), любезно предоставленную Сотрудничающим центром ВОЗ по гриппу (CDC, Атланта, США).

Перед работой все сыворотки обрабатывали препаратом RDE (Denka Seiken), разрушающим неспецифические ингибиторы. Для этого к 1 объему сыворотки добавляли 3 объема RDE. Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 16 - 18 ч. Затем сыворотку, обработанную RDE, прогревали при 56°C в течение 30 мин, после чего добавляли 6 объемов физиологического раствора. Таким образом, обработанная RDE сыворотка имела разведение 1:10.

Реакцию торможения гемагглютинации проводили по следующей схеме, рекомендованной ВОЗ (WHO, 2011). Обязательно на каждой планшете ставили контроль антигена (титрование вируса двукратными разведениями на ФСБ без добавления сыворотки) и контроль эритроцитов (50 мкл ФСБ). Планшеты инкубировали при 4 оС. Учет реакции проводили после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках.

Оценку результатов РТГА начинали с контрольных лунок планшета. В лунках, содержащих только эритроциты, реакция должна быть четко отрицательной (отсутствие гемагглютинации). Затем учитывали лунки контроля антигена, подтверждающие, что разведение выполнено правильно и в 25 мкл вирусной суспензии содержится 4 ГАЕ. После этого учитывали результаты титрования негативной сыворотки, не содержащей антител к вирусу гриппа, с используемыми антигенами. Во всех этих лунках должна быть четкая гемагглютинация, свидетельствующая о правильности обработки сывороток и полном удалении неспецифических ингибиторов. Далее учитывали результаты взаимодействия гомологичных референс-сывороток и референс-антигенов (положительный контроль), которые должны быть строго специфичными (ингибция гемагглютинации в этих рядах должна регистрироваться до титров не ниже, чем 1:160). Титром позитивной референс-сыворотки считали ее последнее разведение, обусловившее полное торможение гемагглютинации.

## **МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Выделение РНК**

Выделение вРНК производилось из вирионов, амплифицированных на культуре клеток MDCK, коммерческим набором SV Total RA Isolation System (Promega, США) согласно следующей методике:

100 мкл аллантаоисной жидкости смешивали в 1.5 мл пробирке с 175 мкл лизирующего буфера (RLA), 350 мкл Dilution Buffer и нагревали при 70°C в течение 3 минут.

Центрифугировали 10 мин при 17900×g. Затем к смеси добавили 200 мкл 96%-ого спирта. Полученную смесь наносили на колонку Spin Column и центрифугировали 1 мин при 17900×g. Колонки промыли промывочным буфером (RWA) дважды по 600 и 250 мкл, центрифугируя после каждой промывки по 1 и 2 мин соответственно. Выделенную вирусную РНК смыли 100 мкл воды свободной от нуклеаз. Раствор РНК хранили в замороженном виде (при -20°C) до 3 дней. Раствор РНК хранили при -70°C.

### **Реакция обратной транскрипции**

Постановка реакции осуществлялась с помощью коммерческого набора M-MuLV Reverse Transcriptase (BioLabs, Великобритания) согласно инструкции производителя. Для этого в пробирку объемом 200 мкл вносили 2 мкл 10X Reverse Transcriptase Buffer (состав буфера указан в инструкции производителя), 2 мкл 10 mM dNTPs Mix, 100 о.е. фермента M-MuLV, 1.6 pM праймера Random Hexamer Primer, 10нг – 5мкг вРНК. Доводили общий объем реакции до 20 мкл водой свободной от нуклеаз. Реакцию проводили 1 час при 42°C.

### **Выявление РНК вирусов гриппа методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов.**

Для амплификации генов вируса гриппа был использован набор реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» («АмплиСенс», Россия). Реакция проводилась в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию проводили в приборе Rotor-Gene 6000. Результат амплификации считали достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

### **Определение первичной последовательности генов**

#### **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

Для проведения ПЦР использовали коммерческий набор Quick-Load Taq 2X Master Mix (BioLabs, Великобритания) согласно следующему протоколу: 12,5 мкл Quick-Load Taq 2X Master Mix, по 0,5 мкл 10mM раствора прямого и обратного праймеров, <1000 нг раствора ДНК, безнуклеазная вода - до 25 мкл.

Реакция осуществлялась в следующем температурном режиме:

Стадия	Температура, °С	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	95	2 мин	1 цикл
Денатурация	94	30 сек	40 циклов
Отжиг праймеров	50	20 сек	
Элонгация	68	2 мин	

### **Разделение продуктов амплификации и их очистка**

Разделение продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле с использованием TAE буфера. Визуализацию проводили после окраски бромистым этидием при освещении УФ-светом. Длина фрагментов продуктов реакции определялась в сравнении с используемым ДНК-маркером (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Литва).

Элюцию фрагментов ДНК из геля производили коммерческим набором QIAquick Gel Extraction Kit (Quagen, Германия) согласно протоколу производителя. Водный раствор ДНК хранили при -20°C.

### **Определение нуклеотидных последовательностей ДНК**

Постановку секвенирующей реакции осуществляли коммерческим набором BigDye Terminator 3.1v Cyler (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя.

Секвенирующую реакцию проводили с праймерами M13 (M13-F 5'-TGTA AACGACGGCCAGT – 3'; M13-R 5'-CAGGAAACAGCTATGACC – 3') (Ghedini, 2005).

Реакцию осуществляли в следующем температурном режиме:

Стадия	Температура, °С	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	95	2 мин	1 цикл
Денатурация	94	30 сек	40 циклов
Отжиг праймеров	50	20 сек	
Элонгация	60	4 мин	

Очистку секвенирующей реакции производили коммерческим набором BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя. Для этого в пробирку с секвенирующей реакцией добавляли 40 мкл SAM Solution и 10 мкл XTerminator Solution. Содержимое пробирок перемешивали в шейкере в течение 30 мин при 1400 об/мин. Затем пробирки центрифугировали 2 мин при 4000 об/мин. Надосадочную



жидкость в объеме 15 мкл переносили в планшет MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystem, США).

Определение первичных последовательностей осуществляли в автоматическом анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США) согласно инструкции производителя.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием специализированного программного обеспечения: Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), SeqMan (Lasergene) и специализированных ресурсов Influenza Virus Resource (Бао, 2008) и BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). Анализ аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu](http://www.mbio.ncsu.edu)).

### **Филогенетический анализ и 3D-моделирование**

Филогенетические дендрограммы на основе выровненных аминокислотных последовательностей строили с помощью программы MEGA5 методом «максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML)». Для оценки достоверности локальной топологии в филогенетических деревьях применяли бутстреп-тест (500 репликаций). Для построения филогенетических сетей (сплитграфов) применялась программа SplitsTree 4 (Huson, 1998; Huson, 2006.). Построение 3D-моделей пространственных структур HA и NA выполнялось в программе PyMol 1.7.4.5.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Азиатская часть Российской Федерации в целом и Новосибирская область, в частности, являются интересными с точки зрения исследования вируса гриппа. На этой территории расположены несколько городов (Новосибирск, Владивосток, Красноярск, Владивосток), являющихся крупными транспортными узлами между Китаем, Средней Азией и Европой и это обуславливает наличие значительного пассажиропотока, что, в свою очередь, создает благоприятные условия для распространения вируса гриппа. Кроме того, эта территория расположена на пути распространения вируса гриппа из Южной и Юго-Восточной Азии (именно с этих территорий обычно начинаются сезонные эпидемии гриппа). С другой стороны – азиатская часть России неравномерно заселена: население сосредоточено в городах, разделенных значительными расстояниями. Т.е. при заносе патогена извне – с высокой вероятностью он будет циркулировать локально, в нескольких ближайших населенных пунктах.

С 2008 по 2013 года на территории азиатской части РФ осуществлялся сбор клинических образцов от пациентов с проявлением симптомов ОРВИ. Всего было собрано 2640 проб (Рис. 11), из которых было выделено 416 изолятов вирусов гриппа различных типов и субтипов (Рис 12).

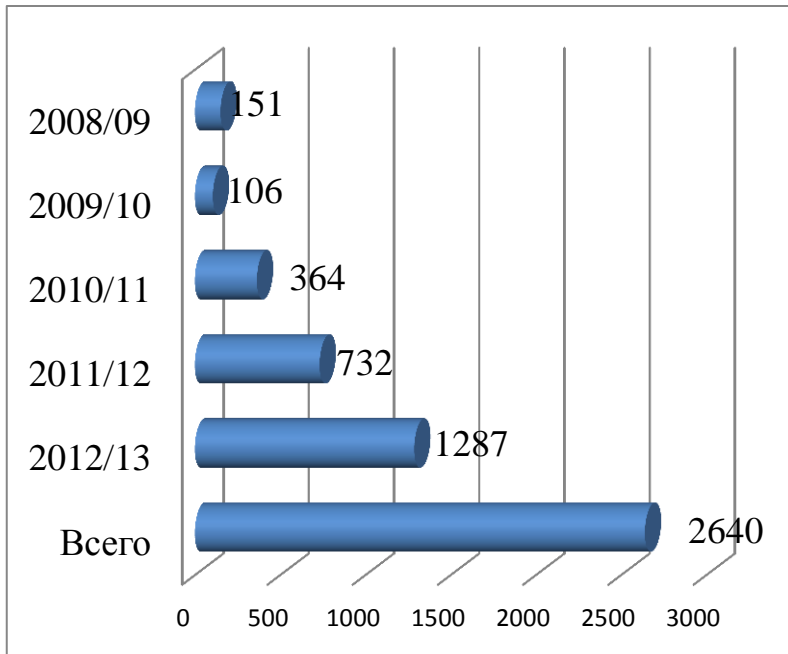


Рисунок 11. Сбор клинических образцов

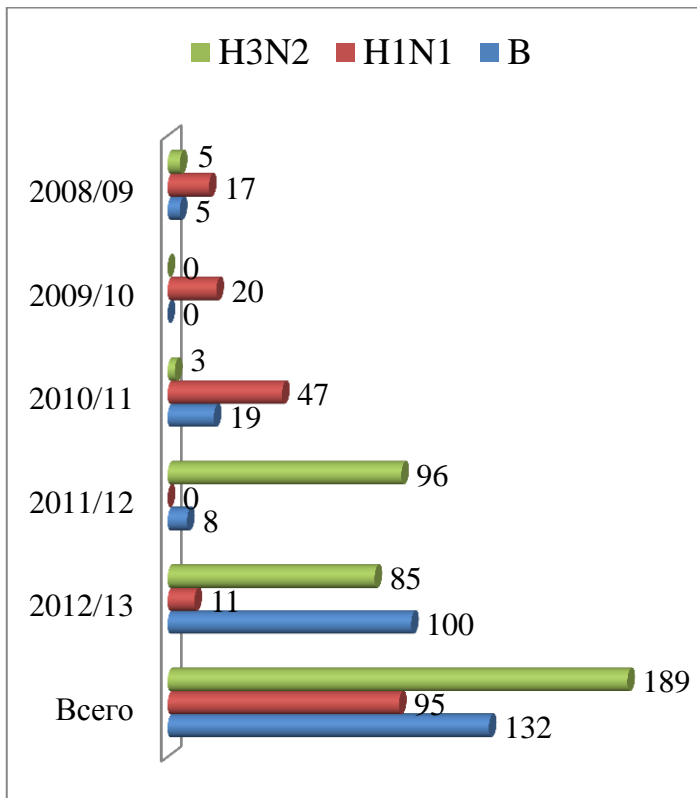


Рисунок 12. Изоляция штаммов вирусов гриппа.

Для дальнейшего изучения (определение первичной структуры сегментов генома, кодирующих поверхностные гликопротеины и анализ их изменчивости) были отобраны 29 изолятов вируса гриппа A(H3N2) и 36 изолятов вируса гриппа типа В. Критериями выбора были расположение места сбора образцов, количество выделенных штаммов, собранных в конкретном географическом регионе и антигенные свойства штаммов.

В результате пандемии вируса гриппа A(H1N1) pdm09 прежний, сезонный, вариант A(H1N1) был элиминирован из вирусной популяции, циркулировавшей среди людей. Количество обнаруживаемых штаммов вирусов гриппа A(H3N2) и В значительно снизилось в период пандемии, но все же эти вирусы не были вытеснены из популяции. Эта работа сфокусирована на сезонных вирусах гриппа A(H3N2) и В с целью изучения изменчивости их основных антигенов в условиях пандемии A(H1N1) pdm09.

### 3.1 Анализ изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа А(Н3N2)

Всего в рамках этой работы было исследовано 29 изолятов вируса гриппа А(Н3N2) (табл. 1).

Таблица 1. Штаммы вируса гриппа А(Н3N2), для которых были определены первичные структуры генов НА и NA.

Название штамма	Сезон	Генетическая клада НА	Генетическая клада NA
A/Novosibirsk/31/2009	8/9	Brisbane/10	Brisbane/10
A/Novosibirsk/319/2009	8/9	Brisbane/10	Brisbane/10
A/Novosibirsk/628/2009	8/9	Brisbane/10	Brisbane/10
A/Novosibirsk/707/2009	8/9	Brisbane/10	Brisbane/10
A/Novosibirsk/1211/2009	8/9	Brisbane/10	Brisbane/10
A/Novosibirsk/76K/2011	10/11	Perth/16 (1)	Perth/16 (1)
A/Novosibirsk/1832/2011	10/11	Perth/16 (1)	Perth/16 (1)
A/Novosibirsk/1927/2011	10/11	Perth/16 (1)	Perth/16 (1)
A/Novosibirsk/02d/2012	11/12	Victoria/208 (3B)	Victoria/208 (3B)
A/Novosibirsk/13/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Novosibirsk/16/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Novosibirsk/22/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Novosibirsk/23k/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Novosibirsk/26k/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Novosibirsk/59d/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Novosibirsk/155/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Krasnoyarsk/10/2012	11/12	Victoria/208 (3C)	Victoria/208 (3C)
A/Tyumen/03/2012	11/12	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Novosibirsk/3k/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Novosibirsk/04/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Novosibirsk/77d/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Novosibirsk/88d/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Omsk/25/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Omsk/44/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Krasnoyarsk/919/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Krasnoyarsk/963/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Novosibirsk/76/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Novosibirsk/77/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)
A/Novosibirsk/79/2013	12/13	Victoria/208 (3C.3)	Victoria/208 (3C.3)

В период пандемии гриппа А(Н1N1) pdm09 (эпидемический сезон 2009-2010 гг.) на территории азиатской части РФ не было обнаружено штаммов вируса гриппа А(Н3N2). Таким образом, в этом исследовании проанализированы эпидемические сезоны 2008-2009 гг., 2010-2011 гг., 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг.

Были определены полные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих поверхностные гликопротеины (НА и NA), и по этим двум сегментам генома осуществлен сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ. Все последовательности депонированы в международную базу данных GenBank. Кроме последовательностей генома выделенных в рамках этой работы изолятов, в исследовании в качестве эталонных последовательностей использовались нуклеотидные последовательности НА и NA вакцинных штаммов: A/Brisbane/10/2007, A/Perth/16/2009 и A/Victoria/361/2011.

Анализ выполнялся на двух уровнях: на уровне нуклеотидной последовательности сегментов генома, кодирующих поверхностные гликопротеины, и на уровне последовательностей аминокислотных остатков. Изменения на нуклеотидном уровне, в отличие от аминокислотного, включают в себя не только несинонимичные замены, но и синонимичные. Т.е. именно сравнение нуклеотидных последовательностей исследованных штаммов, как между собой, так и относительно вакцинных эталонов позволяет оценить генетическую изменчивость. А изменение аминокислотных последовательностей показывает процесс появления, накопления и фиксации замен, которые могут непосредственно влиять на характеристики белков, в первую очередь на их антигенные свойства.

Для сравнительного анализа первичных структур генов НА и NA использовались несколько методов: построение матрицы попарных генетических дистанций, построение филогенетических дендрограмм и филогенетических сетей. Матрицы попарных генетических дистанций позволяют в численной форме оценить и сравнить различия (или идентичность, если рассматривать обратную величину) нуклеотидных последовательностей, как в пределах отдельных эпидемических сезонов, так и между штаммами, выделенными в разные сезоны. Филогенетические деревья и сплитграфы (филогенетические сети) визуализируют филогенетические связи между последовательностями. Филогенетические дендрограммы являются наиболее широко используемым в мировой практике способом представления филогенетических связей и позволяют в «классической» древовидной форме оценивать вектор и степень изменчивости штаммов вируса гриппа. А сплитграфы, базируясь на том, что изменчивость имеет не древовидную, а сетевую структуру, показывают взаимосвязи между всеми анализируемыми последовательностями, что позволяет в более удобной форме визуализировать выделение отдельных филогенетических групп.

Для анализа совокупности аминокислотных последовательностей НА и NA также использовались матрицы попарных дистанций (на аминокислотном уровне) и построение соответствующих дендрограмм. Кроме того, был осуществлен анализ аминокислотных замен (позиции замен, их принадлежность к антигенным сайтам и влияние на приобретение или

потерю потенциальных сайтов гликозилирования), как относительно вакцинных штаммов, так и непосредственно между исследованными штаммами.

При использовании матриц попарных дистанций необходимо было ввести критерии оценки расстояний. Для этого в анализ были введены эталонные последовательности, в качестве которых были использованы первичные структуры HA и NA вакцинных штаммов. Таким образом, для каждой матрицы были получены дистанции между парами вакцинных штаммов, где один штамм – актуален для конкретного эпидемического сезона, а второй – циркулировал ранее. Дистанцию для такой пары штаммов можно считать значительной, т.к. она отражает накопление нуклеотидных и аминокислотных замен, обусловившее изменение антигенных свойств вируса и смену вакцинного штамма. Минимальная дистанция составляет 0.000 и указывает на идентичность последовательностей. Дистанции между исследуемыми штаммами в пределах отдельных эпидемических сезонов отражают степень гетерогенности пула вирусов, появление нуклеотидных и аминокислотных замен и принадлежность к разным генетическим кладам и группам. При получении для пар штаммов «исследуемый – исследуемый» или «исследуемый – вакцинный» значений дистанций равных или больше, чем в паре вакцинных штаммов – можно считать изменения первичных структур значительными. При дистанциях меньших, чем в паре вакцинных штаммов, целесообразно рассматривать такую пару или пары исследуемых штаммов относительно других в пределах соответствующего эпидемического сезона.

В целом, при анализе использовались несколько критериев:

1) Эволюционные дистанции, филогенетические связи и аминокислотные замены относительно устаревших эталонных/вакцинных штаммов. Для оценки изменчивости исследуемых штаммов относительно циркулировавших ранее и для введения величины (в частности, величины попарных эволюционных дистанций), которая характеризует смену штаммов/эталонов, и, следовательно, соответствует антигенному дрейфу.

2) Эволюционные дистанции, филогенетические связи и аминокислотные замены относительно актуальных вакцинных штаммов. Для оценки изменчивости циркулировавших штаммов в пределах одного или нескольких последовательных (при условии, что не происходило смены вакцинного штамма) сезонов.

3) Эволюционные дистанции, филогенетические связи и аминокислотные замены между исследуемыми штаммами. Для оценки изменчивости на конкретной территории и оценки генетического разнообразия циркулировавших вирусов.

**3.1.1 Молекулярно-генетический анализ изменчивости HA сезонных (эпидемических) штаммов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.**

### Эпидемический сезон 2008-2009

В качестве эталонных последовательностей в матрицы включены нуклеотидные и аминокислотные последовательности HA вакцинных штаммов A/Wisconsin/67/2005 (штамм, включенный в состав вакцины в течение 2006-2008 гг.) и A/Brisbane/10/2007 (вакцинный штамм в эпидемическом сезоне 2008-2009 гг.) (табл. 2). Дистанция между HA вакцинных штаммов равна 0,0110 на нуклеотидном уровне и 0,0163 на аминокислотном. Т.е. именно такие дистанции можно ассоциировать с изменчивостью HA, обусловившей антигенный дрейф и смену вакцинного штамма.

Таблица 2. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей HA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа A(H3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Novosibirsk/31/2009	A/Novosibirsk/319/2009	A/Novosibirsk/628/2009	A/Novosibirsk/707/2009	A/Novosibirsk/1211/2009
	Аминокислотные последовательности						
A/Wisconsin/67/2005		0,0163	0,0219	0,0200	0,0200	0,0200	0,0219
A/Brisbane/10/2007	0,0110		0,0054	0,0036	0,0036	0,0036	0,0054
A/Novosibirsk/31/2009	0,0159	0,0061		0,0018	0,0018	0,0018	0,0036
A/Novosibirsk/319/2009	0,0153	0,0055	0,0006		0,0000	0,0000	0,0018
A/Novosibirsk/628/2009	0,0159	0,0073	0,0036	0,0030		0,0000	0,0018
A/Novosibirsk/707/2009	0,0184	0,0097	0,0061	0,0055	0,0024		0,0018
A/Novosibirsk/1211/2009	0,0165	0,0079	0,0042	0,0036	0,0018	0,0030	
	Нуклеотидные последовательности						

Последовательности HA штаммов вируса гриппа A(H3N2), выделенных в эпидемический сезон 2008-2009 гг., характеризуются гетерогенностью на нуклеотидном уровне. На аминокислотном уровне HA трех штаммов из пяти – идентичны.

Генетические дистанции между HA сибирских штаммов лежат в интервале от 0,0006 до 0,0055 (среднее значение  $0,0034 \pm 0,0016$ ), в зависимости от рассматриваемой пары последовательностей. Отличия нуклеотидной последовательности HA исследуемых штаммов от вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007 более выражены: от 0,0055 до 0,0098, со средним значением  $0,0073 \pm 0,0015$ , что указывает на накопление нуклеотидных замен относительно актуального вакцинного варианта вируса гриппа. При этом генетические дистанции между анализируемыми последовательностями и HA штамма A/Wisconsin/67/2005 гораздо более

значительны: от 0,0153 до 0,0184 (среднее  $0,0164 \pm 0,0011$ ), т.е. все исследованные штаммы по первичной структуре гена НА значительно отличаются от штамма A/Wisconsin/67/2005, ранее входившего в состав вакцины.

На аминокислотном уровне отличия в последовательностях НА между исследованными изолятами и вакцинным штаммом A/Wisconsin/67/2005 ( $0,0200-0,0219$  со средним значением  $0,0208 \pm 0,0009$ ) также (как и на нуклеотидном уровне) выражены по сравнению со штаммом A/Brisbane/10/2007 ( $0,0036-0,0054$  со средним значением  $0,0043 \pm 0,0009$ ). Согласно матрице попарных дистанций, из пяти исследованных штаммов три характеризуются полной идентичностью аминокислотной последовательности НА: A/Novosibirsk/319/2009, A/Novosibirsk/628/2009 и A/Novosibirsk/707/2009.

В НА обнаружено 11 аминокислотных замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих во всех исследованных последовательностях, и 2 спорадические штаммоспецифические замены.

Все штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. содержат по 9 замен (7 в субъединице НА1 и 2 – в НА2) в НА, общих со штаммом A/Brisbane/10/2007 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма A/Wisconsin/67/2005 (табл. 3). При этом 8 обнаруженных в субъединице НА1 мутаций расположены в антигенный сайтах (Lees, 2010) и, следовательно, предположительно ассоциированы с изменением антигенных свойств вируса. Из этих аминокислотных замен 6 общих для исследованных штаммов и штамма A/Brisbane/10/2007, вероятно, обуславливают изменение штамма вируса гриппа А(Н3N2) в составе вакцины (с A/Wisconsin/67/2005 на A/Brisbane/10/2007).

Таблица 3. Сравнительный анализ аминокислотных замен в НА штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам НА. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с актуальным вакцинным штаммом A/Brisbane/10/2007, темно-серым – замены отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	C	E	A	A	A	B	D	B						
	50	62	122	138	140	156	173	186	223	*	361	375	431	450
A/Wisconsin/67/2005	G	E	D	S	K	Q	K	V	I	*	I	N	L	R
A/Brisbane/10/2007	E		N	A	I	H		G	V	*		D		K
A/Novosibirsk/31/2009	E		N	A	I	H	Q	G	V	*	R	D	M	K
A/Novosibirsk/319/2009	E		N	A	I	H	Q	G	V	*	R	D		K
A/Novosibirsk/628/2009	E		N	A	I	H	Q	G	V	*	R	D		K
A/Novosibirsk/707/2009	E		N	A	I	H	Q	G	V	*	R	D		K
A/Novosibirsk/1211/2009	E	G	N	A	I	H	Q	G	V	*	R	D		K

Обнаруженные ключевые аминокислотные замены G50E и K140I относительно НА штамма A/Wisconsin/67/2005 позволяют отнести исследованные штаммы к генетической кладе Brisbane/10 (WHO, 2009). А замена K173Q (в антигенном сайте D), наряду с заменой I361R



указывают на то, что исследованные российские штаммы по структуре НА представляют собой дрейфовые варианты вируса, относительно актуального вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007, при этом только одна замена не относится к антигенным сайтам.

Аминокислотная замена в позиции 122 НА всех исследованных штамма эпидемического сезона 2008-2009 привела к возникновению потенциального сайта гликозилирования NES<sub>122-124</sub> и могла быть связана с изменением антигенных характеристик вируса.

#### Эпидемический сезон 2010-2011

Т.к. в эпидемический сезон 2009-2010 гг. все варианты вируса гриппа А(Н3N2) и вируса гриппа В на территории сбора образцов были вытеснены из циркуляции пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1) pdm09 (или же циркулировали в ничтожно малых количествах), в рамках этой работы сезон 2009-2010 гг. не рассматривается.

В течение эпидемического сезона 2010-2011 вакцинным штаммом вируса гриппа А(Н3N2) был A/Perth/16/2009. Последовательности НА и NA этого штамма были использованы в качестве референс-последовательностей в построении матрицы попарных дистанций в дополнение к более ранним вакцинным штаммам A/Wisconsin/67/2005 и A/Brisbane/10/2007, которые были включены в матрицы для оценки последовательного накопления мутаций относительно прототипных вариантов вируса (табл. 4).

Таблица 4. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Novosibirsk/76K/2011	A/Novosibirsk/1832/2011	A/Novosibirsk/1927/2011
Аминокислотные последовательности						
A/Wisconsin/67/2005		0,0163	0,0293	0,0368	0,0330	0,0368
A/Brisbane/10/2007	0,0110		0,0127	0,0219	0,0182	0,0219
A/Perth/16/2009	0,0184	0,0097		0,0127	0,0091	0,0127
A/Novosibirsk/76K/2011	0,0259	0,0172	0,0098		0,0036	0,0072
A/Novosibirsk/1832/2011	0,0247	0,0159	0,0085	0,0024		0,0036
A/Novosibirsk/1927/2011	0,0247	0,0159	0,0085	0,0036	0,0024	
Нуклеотидные последовательности						

Генетическая дистанция между НА актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009 и предыдущего (A/Brisbane/10/2007) составила 0,0097. Расстояние между аминокислотными

последовательностями - 0,0127. При этом дистанция между НА A/Perth/16/2009 и A/Wisconsin/67/2005 (более ранний, чем A/Brisbane/10/2007 вакцинный штамм) составила 0,0184 и 0,0293 на нуклеотидном и аминокислотном уровне, соответственно. Это в 1,9 и 2,3 раза превышает значения для пары «A/Perth/16/2009 - A/Brisbane/10/2007», что на примере вакцинных штаммов показывает накопление мутаций при смене эпидемических сезонов.

Совокупность последовательностей (нуклеотидных и аминокислотных) НА штаммов вируса гриппа, выделенных в эпидемический сезон 2010-2011 гг., характеризуется гетерогенностью. Все исследованные штаммы дистанцированы друг от друга (хотя и незначительно в сравнении с дистанциями от вакцинных штаммов): на нуклеотидном уровне дистанции составляют 0,0024 и 0,0036 (среднее значение  $0,0028 \pm 0,0006$ ), а аминокислотном - 0,0036 и 0,0072 ( $0,0048 \pm 0,0017$ ). Выявлено увеличение дистанций между НА исследованных штаммов и предыдущих вакцинных штаммов A/Wisconsin/67/2005 и A/Brisbane/10/2007, что, также как и в случае с парами вакцинных штаммов разных эпидемических сезонов, свидетельствует о накоплении замен и генетическом дрейфе. Примечательно, что генетические дистанции между сибирскими штаммами и актуальным вакцинным штаммом A/Perth/16/2009 (0,0098 и 0,0085) близки к аналогичному показателю (0,0097) для пары штаммов «A/Perth/16/2009 - A/Brisbane/10/2007», т.е. исследованные в этой работе штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг., генетически отличаются от актуального вакцинного штамма почти также как он отличается от предыдущего эталонного штамма. Кроме того, на уровне аминокислотной последовательности НА сибирские штаммы также отличны от штамма A/Perth/16/2009.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине, обнаружено 10 замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих во всех исследованных последовательностях и 5 спорадических замен в отдельных штаммах (табл. 5).

Все штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. содержат по 6 замен в НА, общих с актуальным вакцинным штаммом A/Perth/16/2009 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007.

При этом 11 из 12 обнаруженных в субъединице НА1 аминокислотных замен расположены в антигенных сайтах (Lees, 2010) и, вероятно, ассоциированы с изменением антигенных свойств вируса. Изменение штамма вируса гриппа А(Н3N2) в составе вакцины (с A/Brisbane/10/2007 на A/Perth/16/2009), вероятно, связано с появлением 5 замен, общих для исследованных штаммов и штамма A/Perth/16/2009.

Наличие замен E50K (в антигенном сайте D), I260M (антигенный сайт E) и R261Q (антигенный сайт E) наряду с заменой P162S, а также значения попарных дистанций указывают

на то, что исследованные российские штаммы по структуре HA представляют собой дрейфовые варианты, относительно актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009.

Таблица 5. Сравнительный анализ аминокислотных замен в HA штаммов вируса гриппа A(H3N2), изолированных в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам HA. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с актуальным вакцинным штаммом A/Perth/16/2009, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	C	E	A	A	B		D	D	B	D	E	E				
	50	62	124	144	158	162	167	173	189	214	260	261	*	361	400	522
A/Brisbane/10/2007	E	E	S	N	K	P	T	K	N	I	I	R	*	I	S	I
A/Perth/16/2009	E	K		K	N			Q	K	S			*	R		
A/Novosibirsk/76K/2011	K	K		K	N	S	I	Q	K		M	Q	*	R	L	
A/Novosibirsk/1832/2011	K	K		K	N	S		Q	K		M	Q	*	R		
A/Novosibirsk/1927/2011	K	K	N	K	N	S		Q	K		M	Q	*	R		M

Обнаруженные ключевые аминокислотные замены E62K, N144K, K173Q, K158N и N189K относительно HA штамма A/Brisbane/10/2007 позволяют отнести все исследованные штаммы к генетической кладе Perth/16 (WHO, 2011). А замены E50K, P162S, I260M и R261Q являются характерными для генетической группы 1 клады Perth/16.

Аминокислотная замена в позиции 144 HA всех исследованных штаммов эпидемического сезона 2010-2011 гг. привела к утере потенциального сайта гликозилирования NNS<sub>144-146</sub>. Кроме того, наличие замен S124N (в HA штамма A/Novosibirsk/1927/2011) и T167I (в HA штамма A/Novosibirsk/76K/2011) обусловило потерю потенциальных сайтов гликозилирования NES<sub>122-124</sub> и NVT<sub>165-167</sub> соответственно.

### Эпидемический сезон 2011-2012

Согласно рекомендациям ВОЗ (WHO, 2011) в качестве вакцинного штамма вируса гриппа A(H3N2) в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг. все еще использовался штамм A/Perth/16/2009. Но при этом пул вирусов гриппа A(H3N2) уже был представлен двумя генетическими кладами: Perth/16 и Victoria/208.

По матрице попарных дистанций (табл. 6) все исследованные российские штаммы значительно отличались от вакцинного штамма A/Perth/16/2009: 0,0141 – 0,0178 (0,0164±0,0010) на нуклеотидном уровне и 0,0163 – 0,0238 (0,0217±0,0019) на аминокислотном. Эти значения превышают попарные эволюционные дистанции между парами «актуальный вакцинный штамм – предыдущий вакцинный штамм», показанными в рамках этой работы для более ранних эпидемических сезонов 2008-2009 гг. и 2010-2011 гг..

Таблица 6. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Victoria/361/2011	A/Novosibirsk/02d/2012	A/Novosibirsk/13/2012	A/Novosibirsk/16/2012	A/Novosibirsk/22/2012	A/Novosibirsk/23k/2012	A/Novosibirsk/26k/2012	A/Novosibirsk/59d/2012	A/Novosibirsk/155/2012	A/Krasnoyarsk/10/2012	A/Tyumen/03/2012
	Аминокислотные последовательности													
A/Wisconsin/67/2005		0,0163	0,0293	0,0292	0,0311	0,0367	0,0367	0,0386	0,0385	0,0367	0,0367	0,0367	0,0367	0,0367
A/Brisbane/10/2007	0,0110		0,0127	0,0218	0,0181	0,0237	0,0237	0,0256	0,0255	0,0237	0,0237	0,0237	0,0237	0,0237
A/Perth/16/2009	0,0184	0,0097		0,0200	0,0163	0,0219	0,0219	0,0238	0,0237	0,0219	0,0219	0,0219	0,0219	0,0219
A/Victoria/361/2011	0,0240	0,0178	0,0147		0,0108	0,0109	0,0109	0,0127	0,0109	0,0090	0,0109	0,0109	0,0109	0,0090
A/Novosibirsk/02d/2012	0,0246	0,0172	0,0141	0,0079		0,0145	0,0145	0,0163	0,0145	0,0127	0,0145	0,0145	0,0145	0,0127
A/Novosibirsk/13/2012	0,0259	0,0184	0,0153	0,0049	0,0091		0,0000	0,0018	0,0072	0,0054	0,0000	0,0000	0,0000	0,0054
A/Novosibirsk/16/2012	0,0259	0,0196	0,0165	0,0061	0,0104	0,0012		0,0018	0,0072	0,0054	0,0000	0,0000	0,0000	0,0054
A/Novosibirsk/22/2012	0,0265	0,0203	0,0172	0,0073	0,0116	0,0024	0,0024		0,0091	0,0072	0,0018	0,0018	0,0018	0,0072
A/Novosibirsk/23k/2012	0,0259	0,0196	0,0165	0,0055	0,0098	0,0030	0,0030	0,0042		0,0018	0,0072	0,0072	0,0072	0,0054
A/Novosibirsk/26k/2012	0,0253	0,0190	0,0159	0,0049	0,0091	0,0024	0,0024	0,0036	0,0006		0,0054	0,0054	0,0054	0,0036
A/Novosibirsk/59d/2012	0,0259	0,0209	0,0178	0,0085	0,0128	0,0036	0,0036	0,0049	0,0055	0,0049		0,0000	0,0000	0,0054
A/Novosibirsk/155/2012	0,0253	0,0190	0,0159	0,0055	0,0098	0,0006	0,0006	0,0018	0,0024	0,0018	0,0030		0,0000	0,0054
A/Krasnoyarsk/10/2012	0,0265	0,0203	0,0171	0,0067	0,0110	0,0018	0,0018	0,0030	0,0036	0,0030	0,0042	0,0012		0,0054
A/Tyumen/03/2012	0,0265	0,0203	0,0172	0,0061	0,0104	0,0036	0,0036	0,0049	0,0030	0,0024	0,0061	0,0030	0,0042	
	Нуклеотидные последовательности													

В качестве эталонных последовательностей использовались также первичные структуры НА штамма A/Victoria/361/2011, относящегося к кладе Victoria/208 и рекомендованного в состав вакцины в феврале 2012 г. (WHO, 2012). Дистанция между этим штаммом и вакцинным штаммом A/Perth/16/2009 составила 0,0147 и 0,0200 для нуклеотидной и аминокислотной последовательности НА соответственно. A/Victoria/361/2011 отличается от более ранних, чем A/Perth/16/2009, эталонных штаммов в большей степени: дистанции в паре «A/Victoria/361/2011 - A/Brisbane/10/2007» равны 0,0178 и 0,0218, а паре «A/Victoria/361/2011 - A/Wisconsin/67/2005» - 0,0240 и 0,0292.

Следовательно, штаммы каждого следующего эпидемического сезона продолжали накапливать мутации не только относительно предыдущего сезона, но и относительно более ранних сезонов.

Последовательности НА всех исследованных штаммов дистанцированы друг от друга на нуклеотидном уровне. Генетические дистанции в большинстве пар штаммов (за исключением пар с A/Novosibirsk/02d/2012) составляют от 0,0006 до 0,0055 ( $0,0029 \pm 0,0014$ ). На аминокислотном уровне 50% штаммов характеризуется полной идентичностью НА: A/Novosibirsk/13/2012, A/Novosibirsk/16/2012, A/Novosibirsk/59d/2012, A/Novosibirsk/155/2012 и A/Krasnoyarsk/10/2012. Т.е. НА этих штаммов различаются только на уровне нуклеотидной последовательности за счет синонимических нуклеотидных замен. При этом данные штаммы с одинаковой первичной структурой белка НА изолированы в разных географических регионах: A/Novosibirsk/13/2012, A/Novosibirsk/16/2012 и A/Novosibirsk/155/2012 – на территории города Новосибирска, A/Novosibirsk/59d/2012 – в селе Довольное (Новосибирская область) и A/Krasnoyarsk/10/2012 – в г. Красноярске. Для остальных штаммов дистанции между аминокислотными последовательностями НА лежат в интервале от 0,0018 до 0,0054 ( $0,0039 \pm 0,0012$ ).

Из совокупности исследованных штаммов как по нуклеотидной так и по аминокислотной последовательности НА выделяется штамм A/Novosibirsk/02d/2012, который наиболее дистанцирован от остальных штаммов эпидемического сезона 2011-2012 гг. Генетические дистанции между A/Novosibirsk/02d/2012 и остальными штаммами в пределах эпидемического сезона составляют от 0,0091 до 0,0128 ( $0,0104 \pm 0,0011$ ), а аминокислотные – от 0,0127 до 0,0163 ( $0,0143 \pm 0,0010$ ). При этом генетическая дистанция между НА штамма A/Novosibirsk/02d/2012 и штамма A/Victoria/361/2011 (0,0079) не выходит за пределы интервала 0,0049 - 0,0085, в котором лежат дистанции между исследованными российскими изолятами и A/Victoria/361/2011 (среднее значение  $0,0063 \pm 0,0012$ ). На аминокислотном уровне также нет выраженного различия – дистанция от вакцинного штамма составляет 0,0108, при том, что расстояние остальных штаммов от A/Victoria/361/2011 лежит в интервале 0,0090 – 0,0127

(0,0107±0,0010). Таким образом, можно заключить, что штамм A/Novosibirsk/02d/2012, согласно матрице попарных генетических дистанций, вместе с другими исследованными штаммами принадлежит к Victoria/361-подобным штаммам, но его можно выделить в группу, отдельную от прочих рассмотренных в рамках этой работы штаммов эпидемического сезона 2011-2012 гг.

Также, как и для актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011, показано увеличение (по сравнению со штаммами предыдущих эпидемических сезонов) дистанций между HA исследованных штаммов и более ранних вакцинных штаммов A/Wisconsin/67/2005, A/Brisbane/10/2007 и A/Perth/16/2009, что свидетельствует о кумулятивном характере накопления замен.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине, обнаружено 14 замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих в большинстве исследованных последовательностей, 5 спорадических замен в отдельных штаммах и замена L428I, обнаруженная в двух штаммах из 10 (табл. 7). За исключением A/Novosibirsk/02d/2012, штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. содержат по 8 замен (ряд штаммов кроме того дополнительно содержит замену в положении 198) в HA, общих со штаммом A/Victoria/361/2011 и отличающих их от штамма A/Perth/16/2009.

Большая часть всех замен (14 из 17), обнаруженных в субъединице HA1 расположены в антигенных сайтах (Lees, 2010) и, исходя из этого, вероятно, ассоциированы с изменением антигенных свойств вируса. Из этих аминокислотных замен 7, общих для исследованных штаммов и штамма A/Victoria/361/2011, обусловили смену вакцинного штамма вируса гриппа A(H3N2) с A/Perth/16/2009 на A/Victoria/361/2011.

Наличие замен T128N (в антигенном сайте B), V186G (антигенный сайт B), S198P (антигенный сайт B) и N278Q (антигенный сайт C) наряду с заменой Q33R указывают на то, что исследованные российские штаммы по структуре HA представляют собой дрейфовые варианты, уже относительно A/Victoria/361/2011.

Наличие аминокислотной замены T212A позволяет отнести исследованные штаммы по структуре гемагглютинина к генетической кладе Victoria/208 (WHO, 2011), а замены V223I и N312S характерны для генетических подгрупп 3C и 3B этой клады. Исходя же из наличия замен S45N и T48I HA исследованных штаммов эпидемического сезона 2011-2012, кроме HA штамма A/Novosibirsk/02d/2012, относится к генетической подгруппе клады 3C, а гемагглютинин штамма A/Novosibirsk/02d/2012, согласно наличию замен N145S и D487N – к генетической подгруппе 3B клады Victoria/208.

Таблица 7. Сравнительный анализ аминокислотных замен в НА штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам НА. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие со штаммом A/Victoria/361/2011, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

		C	C	E	E	B	A	A	B	B	B	D	D		C	C					
	7	33	45	48	57	62	128	144	145	156	186	198	212	214	223	278	312	*	408	428	487
A/Perth/16/2009	D	Q	S	T	Q	K	T	K	N	H	G	A	T	S	V	N	N	*	D	L	D
A/Victoria/361/2011			N	I		E		N		R	V	S	A	I	I		S	*			
A/Novosibirsk/02d/2012						E		N	S			S	A	I	I		S	*			N
A/Novosibirsk/13/2012		R	N	I		E	N	N				P	A	I	I	K	S	*			
A/Novosibirsk/16/2012		R	N	I		E	N	N				P	A	I	I	K	S	*			
A/Novosibirsk/22/2012	G	R	N	I		E	N	N				P	A	I	I	K	S	*			
A/Novosibirsk/23k/2012		R	N	I		E		N				S	A	I	I	K	S	*	N	I	
A/Novosibirsk/26k/2012		R	N	I		E		N				S	A	I	I	K	S	*		I	
A/Novosibirsk/59d/2012		R	N	I		E	N	N				P	A	I	I	K	S	*			
A/Novosibirsk/155/2012		R	N	I		E	N	N				P	A	I	I	K	S	*			
A/Krasnoyarsk/10/2012		R	N	I		E	N	N				P	A	I	I	K	S	*			
A/Tyumen/03/2012		R	N	I	K	E		N				S	A	I	I	K	S	*			

Аминокислотная замена в позиции 45 НА всех исследованных штаммов эпидемического сезона 2011-2012 (кроме A/Novosibirsk/02d/2012) приводит к приобретению потенциального сайта гликозилирования NSS<sub>45-47</sub>. Аминокислотная замена T128N приводит к утере потенциального сайта гликозилирования NWT<sub>126-128</sub> у штаммов A/Novosibirsk/13/2012, A/Novosibirsk/16/2012, A/Novosibirsk/59d/2012, A/Novosibirsk/155/2012 и A/Krasnoyarsk/10/2012.

### **Эпидемический сезон 2012-2013**

В анализе посредством матрицы попарных дистанций состав референс-последовательностей оставлен неизменным относительно предыдущего эпидемического сезона, т.к. актуальным вакцинным штаммом являлся A/Victoria/361/2011. Таким образом, попарные дистанции между вакцинными штаммами различных эпидемических сезонов также были неизменны и значения, приведенные выше для сезона 2011-2012 гг., также верны и для сезона 2012-2013 (табл. 8).

Последовательности НА исследованных штаммов (за исключением пар A/Novosibirsk/88d/2013, A/Novosibirsk/77d/2013 и A/Novosibirsk/77/2013, A/Novosibirsk/04/2013) дистанцированы друг от друга на нуклеотидном уровне. Значения попарных дистанций лежат в интервале 0,0012 – 0,0061, со средним значением  $0,0037 \pm 0,0014$ . А для пар штаммов «A/Novosibirsk/88d/2013 - A/Novosibirsk/77d/2013» и «A/Novosibirsk/77/2013 - A/Novosibirsk/04/2013» генетические дистанции равны 0.0000, т.е. последовательности НА этих изолятов идентичны на нуклеотидном, а, следовательно, и на аминокислотном уровне.

На аминокислотном уровне ряд штаммов характеризуется полной идентичностью НА:

- 1) A/Novosibirsk/04/2013, A/Krasnoyarsk/963/2013, A/Novosibirsk/77/2013
- 2) A/Novosibirsk/77d/2013, A/Novosibirsk/88d/2013, A/Omsk/25/2013, A/Omsk/44/2013.

Клинические образцы, из которых изолированы эти штаммы, были собраны в различных населенных пунктах: г. Новосибирск и г. Красноярск для первой группы и с. Довольное (Новосибирская область) и г. Омск – для второй.

Для остальных российских штаммов попарные дистанции на аминокислотном уровне составляют от 0,0018 до 0,0054, со средним значением  $0,0039 \pm 0,0012$ . Схожие значения были характерны и для большинства изолятов предыдущего эпидемического сезона. В целом, в пределах эпидемического сезона, по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям НА, исследованные штаммы незначительно (по сравнению с дистанциями от вакцинных штаммов) дистанцированы друг от друга, в отличие от предыдущего эпидемического сезона (2011-2012 гг.) когда штамм A/Novosibirsk/02d/2012 по первичной структуре НА значительно отличался от остальных штаммов сезона.



Таблица 8. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей HA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Victoria/361/2011	A/Novosibirsk/3k/2013	A/Novosibirsk/04/2013	A/Novosibirsk/77d/2013	A/Novosibirsk/88d/2013	A/Omsk/25/2013	A/Omsk/44/2013	A/Krasnoyarsk/919/2013	A/Krasnoyarsk/963/2013	A/Novosibirsk/76/2013	A/Novosibirsk/77/2013	A/Novosibirsk/79/2013
	Аминокислотные последовательности														
A/Wisconsin/67/2005		0,0163	0,0293	0,0292	0,0442	0,0442	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0404	0,0442	0,0423	0,0442	0,0405
A/Brisbane/10/2007	0,0110		0,0127	0,0218	0,0330	0,0311	0,0274	0,0274	0,0274	0,0274	0,0274	0,0311	0,0292	0,0311	0,0274
A/Perth/16/2009	0,0184	0,0097		0,0200	0,0311	0,0293	0,0256	0,0256	0,0256	0,0256	0,0256	0,0293	0,0274	0,0293	0,0256
A/Victoria/361/2011	0,0240	0,0178	0,0147		0,0182	0,0163	0,0127	0,0127	0,0127	0,0127	0,0127	0,0163	0,0145	0,0163	0,0127
A/Novosibirsk/3k/2013	0,0322	0,0253	0,0228	0,0116		0,0018	0,0054	0,0054	0,0054	0,0054	0,0054	0,0018	0,0036	0,0018	0,0054
A/Novosibirsk/04/2013	0,0310	0,0240	0,0215	0,0104	0,0012		0,0036	0,0036	0,0036	0,0036	0,0036	0,0000	0,0018	0,0000	0,0036
A/Novosibirsk/77d/2013	0,0297	0,0228	0,0203	0,0091	0,0061	0,0049		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0036	0,0054	0,0036	0,0036
A/Novosibirsk/88d/2013	0,0297	0,0228	0,0203	0,0091	0,0061	0,0049	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0036	0,0054	0,0036	0,0036
A/Omsk/25/2013	0,0291	0,0221	0,0196	0,0085	0,0043	0,0030	0,0030	0,0030		0,0000	0,0000	0,0036	0,0054	0,0036	0,0036
A/Omsk/44/2013	0,0284	0,0215	0,0190	0,0079	0,0049	0,0036	0,0036	0,0036	0,0018		0,0000	0,0036	0,0054	0,0036	0,0036
A/Krasnoyarsk/919/2013	0,0278	0,0209	0,0184	0,0061	0,0055	0,0043	0,0043	0,0043	0,0024	0,0018		0,0036	0,0054	0,0036	0,0036
A/Krasnoyarsk/963/2013	0,0310	0,0240	0,0215	0,0104	0,0024	0,0012	0,0049	0,0049	0,0030	0,0036	0,0043		0,0018	0,0000	0,0036
A/Novosibirsk/76/2013	0,0297	0,0228	0,0203	0,0079	0,0036	0,0024	0,0061	0,0061	0,0055	0,0061	0,0043	0,0036		0,0018	0,0054
A/Novosibirsk/77/2013	0,0310	0,0240	0,0215	0,0104	0,0012	0,0000	0,0049	0,0049	0,0030	0,0036	0,0043	0,0012	0,0024		0,0036
A/Novosibirsk/79/2013	0,0291	0,0221	0,0196	0,0085	0,0030	0,0018	0,0043	0,0043	0,0024	0,0030	0,0036	0,0030	0,0043	0,0018	
	Нуклеотидные последовательности														

Выявлено увеличение (относительно штаммов предыдущих эпидемических сезонов) попарных дистанций между последовательностями HA исследованных российских штаммов и предыдущих вакцинных штаммов A/Wisconsin/67/2005, A/Brisbane/10/2007 и A/Perth/16/2009, а также относительно штамма A/Victoria/361/2011, что указывает на кумулятивное накопление замен относительно прототипных штаммов.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине, обнаружено 18 замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих в большинстве исследованных последовательностей, 1 спорадическая замена в штамме A/Novosibirsk/79/2013 (табл. 9). Штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. содержат по 9 замен в HA, общих с актуальным вакцинным штаммом A/Victoria/361/2011 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма A/Perth/16/2009. Кроме того, штаммы A/Novosibirsk/76/2013 и A/Novosibirsk/79/2013 дополнительно содержат замены, общие с актуальным вакцинным штаммом A/Victoria/361/2011, в положениях 33 и 145 соответственно.

Большая часть всех замен (15 из 18), обнаруженных в субъединице HA1 расположены в антигенных сайтах (Lees, 2010) и, вероятно, ассоциированы с изменением антигенных свойств вируса. Из этих аминокислотных замен 7, общих для исследованных штаммов и штамма A/Victoria/361/2011, связаны со сменой штамма вируса гриппа A(H3N2) в составе вакцины (с A/Perth/16/2009 на A/Victoria/361/2011).

Наличие замен T128A (в антигенном сайте B), R142G (антигенный сайт A), N145S (антигенный сайт A), R156H (антигенный сайт B), V186G (антигенный сайт B), I260M (антигенный сайт E) и N278Q (антигенный сайт C) наряду с заменой Q33R указывают на то, что исследованные российские штаммы по структуре HA представляют собой дрейфовые варианты, относительно актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011.

Аминокислотные замены в позициях 45 и 144 HA всех исследованных штаммов эпидемического сезона 2012-2013 гг. привели к приобретению потенциальных сайтов гликозилирования  $NSS_{45-47}$  и  $NNS_{144-146}/NSS_{144-146}$  относительно предыдущего вакцинного штамма A/Perth/16/2009. Аминокислотные замены T128N и T128A привели к утрате потенциального сайта гликозилирования  $NWT_{126-128}$ .

Таблица 9. Сравнительный анализ аминокислотных замен в HA штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам HA. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие со штаммом A/Victoria/361/2011, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

Антигенные сайты			C	E	B	A	A	A	A	B	B	B	D	D		E	C	C		
	33	45	48	62	128	140	142	144	145	156	186	198	212	214	223	260	278	312	*	347
A/Perth/16/2009	Q	S	T	K	T	I	R	K	N	H	G	A	T	S	V	I	N	N	*	V
A/Victoria/361/2011		N	I	E				N		R	V	S	A	I	I			S	*	
A/Novosibirsk/3k/2013	R	N	I	E	A	M	G	N	S			S	A	I	I	M	K	S	*	M
A/Novosibirsk/04/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I	M	K	S	*	M
A/Novosibirsk/77d/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I		K	S	*	
A/Novosibirsk/88d/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I		K	S	*	
A/Omsk/25/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I		K	S	*	
A/Omsk/44/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I		K	S	*	
A/Krasnoyarsk/919/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I		K	S	*	
A/Krasnoyarsk/963/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I	M	K	S	*	M
A/Novosibirsk/76/2013		N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I	M	K	S	*	M
A/Novosibirsk/77/2013	R	N	I	E	A		G	N	S			S	A	I	I	M	K	S	*	M
A/Novosibirsk/79/2013	R	N	I	E	A		G	N				S	A	I	I	M	K	S	*	

### 3.1.2 Молекулярно-генетический анализ изменчивости NA сезонных (эпидемических) изолятов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.

#### Эпидемический сезон 2008-2009

Последовательности NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных в эпидемический сезон 2008-2009 гг., характеризуются гетерогенностью как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне.

В качестве эталонных последовательностей в анализ посредством матрицы попарных дистанций, также, как и в случае с HA, включены нуклеотидные и аминокислотные последовательности NA вакцинных штаммов A/Wisconsin/67/2005 (предыдущий вакцинный штамм) и A/Brisbane/10/2007 (актуальный в эпидемическом сезоне 2008-2009 вакцинный штамм) (табл. 10). Дистанция между последовательностями NA в паре вакцинных штаммов равна 0,0122 на нуклеотидном уровне и 0,0189 на аминокислотном.

Таблица 10. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Novosibirsk/31/2009	A/Novosibirsk/319/2009	A/Novosibirsk/628/2009	A/Novosibirsk/707/2009	A/Novosibirsk/1211/2009
	Аминокислотные последовательности						
A/Wisconsin/67/2005		0,0189	0,0253	0,0232	0,0295	0,0295	0,0317
A/Brisbane/10/2007	0,0122		0,0105	0,0084	0,0147	0,0147	0,0168
A/Novosibirsk/31/2009	0,0173	0,0078		0,0063	0,0126	0,0126	0,0147
A/Novosibirsk/319/2009	0,0144	0,0050	0,0071		0,0063	0,0084	0,0126
A/Novosibirsk/628/2009	0,0173	0,0079	0,0100	0,0057		0,0021	0,0105
A/Novosibirsk/707/2009	0,0158	0,0064	0,0086	0,0050	0,0021		0,0105
A/Novosibirsk/1211/2009	0,0158	0,0071	0,0093	0,0064	0,0064	0,0050	
	Нуклеотидные последовательности						

Генетические дистанции между NA сибирских штаммов лежат в интервале от 0,0021 до 0,01 (среднее значение  $0,0066 \pm 0,0022$ ), в зависимости от рассматриваемой пары последовательностей. На уровне аминокислотных последовательностей дистанции лежат в интервале от 0,0021 до 0,0147, со средним значением  $0,0096 \pm 0,0037$ . Разброс значений указывает на вариабельность NA штаммов эпидемического сезона 2008-2009 гг.. Значения попарных генетических дистанций между российскими изолятами и вакцинным штаммом

A/Brisbane/10/2007 лежат в интервале 0,0050 – 0,0079 (среднее значение  $0,0068 \pm 0,0010$ ). По аминокислотным последовательностям эволюционные расстояния от NA штамма A/Brisbane/10/2007 составляют от 0,0084 до 0,0168 (среднее значение  $0,0130 \pm 0,0031$ ). Такие значения схожи с дистанциями между российскими штаммами, т.е. эволюционно российские штаммы равноудалены друг от друга и от актуального вакцинного штамма.

Попарные генетические дистанции между анализируемыми последовательностями и последовательностью NA штамма A/Wisconsin/67/2005 наибольшие: от 0,0143 до 0,0172 (среднее значение  $0,0161 \pm 0,0011$ ), т.е. все исследованные штаммы по первичной структуре гена NA близки к вакцинному штамму A/Brisbane/10/2007 и значительно отличаются от штамма A/Wisconsin/67/2005, ранее входившего в состав вакцины.

На аминокислотном уровне отличия в последовательностях NA между исследованными изолятами и вакцинным штаммом A/Wisconsin/67/2005, также как и в случае с генетическими дистанциями, выражены по сравнению со штаммом A/Brisbane/10/2007. Дистанции составляют 0,0232-0,0317 (среднее:  $0,0278 \pm 0,0031$ ) и 0,0084-0,0168 (среднее значение  $0,0130 \pm 0,0031$ ) соответственно относительно штаммов A/Wisconsin/67/2005 и A/Brisbane/10/2007.

Согласно анализу аминокислотных замен в нейраминидазе, обнаружено 14 замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих в двух и более из исследованных последовательностей и 6 спорадических замен в отдельных штаммах (табл. 11).

Все исследованные штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. содержат по 8 замен в NA, общих с актуальным вакцинным штаммом A/Brisbane/10/2007 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма A/Wisconsin/67/2005. Появление этих аминокислотных замен отражает процесс генетического дрейфа циркулировавших вирусов гриппа относительно предыдущего вакцинного штамма.

Наличие аминокислотных замен H150R, V194I, Y310H, L370S, S372L и N387K позволяет отнести исследованные штаммы по структуре NA к кладе A/Brisbane/10. А наличие замен D147N и I215V указывает на то, что исследованные российские штаммы по структуре NA представляют собой дрейфовые варианты вируса, относительно актуального вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007. Аминокислотные замены в положениях 151, 221, 339 и 463, а также спорадические замены в NA отдельных штаммов указывают не только на наличие антигенного дрейфа относительно вакцинного штамма, но и на гетерогенность (по первичной структуре нейраминидазы) пула исследованных изолятов вируса гриппа эпидемического сезона 2008-2009 гг.

Таблица 11. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг.. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с актуальным вакцинным штаммом А/Brisbane/10/2007, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	30	93	147	150	151	194	215	221	241	310	312	315	325	339	370	372	386	387	463	464
A/Wisconsin/67/2005	I	N	D	H	D	V	I	E	I	Y	I	S	T	D	L	S	P	N	D	I
A/Brisbane/10/2007		D		R		I			M	H	T				S	L		K		
A/Novosibirsk/31/2009		D	N	R		I	V		M	H					S	L	H	K		L
A/Novosibirsk/319/2009		D	N	R	G	I	V		M	H					S	L		K		
A/Novosibirsk/628/2009		D	N	R	G	I	V	D	M	H				N	S	L		K	N	
A/Novosibirsk/707/2009		D	N	R	A	I	V	D	M	H				N	S	L		K	N	
A/Novosibirsk/1211/2009	V	D	N	R		I	V	D	M	H		R	P	D	S	L		K	N	

Аминокислотная замена N93D обуславливает утрату потенциального сайта гликозилирования NIT<sub>93-95</sub> относительно предыдущего вакцинного штамма A/Wisconsin/67/2005. Аминокислотных замен, обуславливающих приобретение или утрату сайтов гликозилирования относительно актуального вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007, не обнаружено.

#### Эпидемический сезон 2010-2011.

В построении матрицы попарных дистанций для NA (табл. 12), как и в случае с последовательностями NA, в качестве референс-штамма использовался актуальный вакцинный штамм A/Perth/16/2009.

Генетическая дистанция между NA актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009 и предыдущего A/Brisbane/10/2007 составила 0,0071. Расстояние между аминокислотными последовательностями - 0,0063. При этом дистанция между NA A/Perth/16/2009 и A/Wisconsin/67/2005 (более ранний, чем A/Brisbane/10/2007 вакцинный штамм) составила 0,0165 и 0,0210 на нуклеотидном и аминокислотном уровне, соответственно. Это на примере вакцинных штаммов показывает накопление мутаций относительно более ранних штаммов.

Пул последовательностей NA штаммов вируса гриппа, выделенных в эпидемический сезон 2010-2011 гг. характеризуется гетерогенностью на нуклеотидном уровне: генетические дистанции между российскими штаммами составляют 0,0014, 0,0057 и 0,0071 (среднее значение  $0,0047 \pm 0,0024$ ). При этом, на аминокислотном уровне последовательности идентичны.

Таблица 12. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа A(H3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Novosibirsk/76K/2011	A/Novosibirsk/1832/2011	A/Novosibirsk/1927/2011
Аминокислотные последовательности						
A/Wisconsin/67/2005		0,0189	0,0210	0,0338	0,0338	0,0338
A/Brisbane/10/2007	0,0122		0,0063	0,0189	0,0189	0,0189
A/Perth/16/2009	0,0165	0,0071		0,0126	0,0126	0,0126
A/Novosibirsk/76K/2011	0,0231	0,0136	0,0151		0,0000	0,0000
A/Novosibirsk/1832/2011	0,0246	0,0151	0,0165	0,0014		0,0000
A/Novosibirsk/1927/2011	0,0276	0,0180	0,0194	0,0057	0,0071	
Нуклеотидные последовательности						

На нуклеотидном уровне исследованные штаммы более дистанцированы от актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009, чем друг от друга. Расстояния от A/Perth/16/2009 составляют 0,0151, 0,0165 и 0,0194 (среднее значение  $0,0170 \pm 0,0018$ ). По первичной структуре сегмента генома, кодирующего NA, дистанции между исследованными изолятами и вакцинным штаммом A/Perth/16/2009 ( $0,0170 \pm 0,0018$ ) незначительно, но превышают аналогичный показатель для штамма A/Brisbane/10/2007 ( $0,0155 \pm 0,0018$ ), при том, что штамм A/Brisbane/10/2007 – более ранний и исключен из состава вакцины. Генетическая дистанция от штамма A/Brisbane/10/2007 меньше не только в среднем, но и для каждой отдельной последовательности NA: 0,0136, 0,0151, 0,0180 при дистанциях от A/Perth/16/2009 равных 0,0151, 0,0165, 0,0194 для штаммов A/Novosibirsk/76K/2011, A/Novosibirsk/1832/2011 и A/Novosibirsk/1927/2011, соответственно. На аминокислотном уровне дистанция между NA исследованных изолятов и штамма A/Brisbane/10/2007 (0,0189) превышает дистанцию от актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009 (0,0126), что коррелирует с изменением состава вакцины. Кроме того, как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне дистанции между исследованными штаммами и актуальным вакцинным штаммом A/Perth/16/2009 превышают дистанции между штаммами A/Perth/16/2009 и A/Brisbane/10/2007. Т.е. исследованные штаммы по последовательности NA отличаются от актуального вакцинного штамма, больше чем этот штамм от предыдущего вакцинного.

Относительно штаммов предыдущего эпидемического сезона показано увеличение дистанций на аминокислотном уровне между NA исследованных штаммов и предыдущих вакцинных штаммов A/Wisconsin/67/2005 и A/Brisbane/10/2007, что свидетельствует о кумулятивном накоплении замен относительно более ранних вакцинных штаммов.

Согласно анализу аминокислотных замен (табл. 13) в нейраминидазе, обнаружено 9 замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих во всех исследованных последовательностях.

Все штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. содержат по 3 замены (D147N, I215V, T312I) в NA, общих с актуальным вакцинным штаммом A/Perth/16/2009 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007.

Кроме того, обнаружено 6 аминокислотных замен, отличающих NA исследованных изолятов не только от предыдущего вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007, но и от актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009. Т.е. исследованные российские штаммы по структуре NA представляют собой дрейфовые варианты, значительно изменившиеся относительно актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009.



Таблица 13. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2), в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг.. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены, общие с актуальным вакцинным штаммом А/Perth/16/2009, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	127	147	215	307	312	338	342	402	430
A/Brisbane/10/2007	D	D	I	I	T	L	N	N	R
A/Perth/16/2009		N	V		I				
A/Novosibirsk/76/2011	N	N	V	M	I	F	D	D	S
A/Novosibirsk/1832/2011	N	N	V	M	I	F	D	D	S
A/Novosibirsk/1927/2011	N	N	V	M	I	F	D	D	S

Обнаруженные ключевые аминокислотные замены D147N и I215V, относительно NA штамма A/Brisbane/10/2007 позволяют отнести исследованные штаммы или к генетической кладе Perth/16, или к генетической кладе A/Victoria/208 (WHO, 2011). Наличие замен D127N, I307M, L338F и N342D позволяет конкретизировать классификацию исследованных штаммов и отнести их по структуре нейраминидазы к генетической группе В клады Perth/16.

Аминокислотная замена в позиции 402 NA всех исследованных штаммов эпидемического сезона 2010-2011 приводит к утере потенциального сайта гликозилирования NRS<sub>402-404</sub>.

#### **Эпидемический сезон 2011-2012**

Согласно матрице попарных дистанций (табл. 14) все исследованные российские штаммы значительно отличались от вакцинного штамма A/Perth/16/2009, принадлежащего генетической кладе Perth/16. Интервалы дистанций составляли 0,0158 – 0,0173 (среднее значение 0,0168±0,0006) на нуклеотидном уровне и 0,0126 - 0,0148 (0,0135±0,0010) на аминокислотном. Эти значения превышали дистанции между парами «актуальный вакцинный штамм – предыдущий вакцинный штамм» показанными в рамках этой работы для более ранних эпидемических сезонов 2008-2009 гг. и 2010-2011 гг.. По этой причине в анализ в качестве референс-штаммы был также включен A/Victoria/361/2011, относящийся к кладе Victoria/208 и рекомендованный в состав вакцины в феврале 2012 гг (WHO, 2012).

Три пары последовательностей NA идентичны на нуклеотидном уровне (генетические дистанции равны 0,0000): пара A/Novosibirsk/155/2012 и A/Novosibirsk/13/2012, пара A/Novosibirsk/22/2012 и A/Krasnoyarsk/10/2012, а также пара A/Novosibirsk/23k/2012 и A/Novosibirsk/26k/2012. При этом штаммы A/Novosibirsk/22/2012 и A/Krasnoyarsk/10/2012 изолированы в разных городах (расстояние около 630 км.). Кроме этих трех пар изолятов, пул исследованных штаммов вируса гриппа А(Н3N2) характеризуется гетерогенностью (дистанции составляют от 0,0007 до 0,0072 со средним значением 0,0029±0,0021) по первичной структуре гена, кодирующего нейраминидазу.

Таблица 14. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Victoria/361/2011	A/Novosibirsk/02d/2012	A/Novosibirsk/13/2012	A/Novosibirsk/16/2012	A/Novosibirsk/22/2012	A/Novosibirsk/23k/2012	A/Novosibirsk/26k/2012	A/Novosibirsk/59d/2012	A/Novosibirsk/155/2012	A/Krasnoyarsk/10/2012	A/Tyumen/03/2012
	Аминокислотные последовательности													
A/Wisconsin/67/2005		0,0190	0,0211	0,0362	0,0340	0,0319	0,0341	0,0319	0,0341	0,0341	0,0341	0,0319	0,0319	0,0319
A/Brisbane/10/2007	0,0122		0,0063	0,0233	0,0190	0,0190	0,0211	0,0190	0,0211	0,0211	0,0211	0,0190	0,0190	0,0190
A/Perth/16/2009	0,0166	0,0071		0,0169	0,0126	0,0127	0,0148	0,0127	0,0148	0,0148	0,0148	0,0127	0,0127	0,0127
A/Victoria/361/2011	0,0283	0,0187	0,0202		0,0084	0,0042	0,0063	0,0042	0,0063	0,0063	0,0063	0,0042	0,0042	0,0042
A/Novosibirsk/02d/2012	0,0254	0,0158	0,0173	0,0100		0,0042	0,0042	0,0042	0,0063	0,0063	0,0063	0,0042	0,0042	0,0042
A/Novosibirsk/13/2012	0,0247	0,0151	0,0166	0,0050	0,0064		0,0021	0,0000	0,0021	0,0021	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000
A/Novosibirsk/16/2012	0,0254	0,0158	0,0173	0,0057	0,0072	0,0021		0,0021	0,0042	0,0042	0,0042	0,0021	0,0021	0,0021
A/Novosibirsk/22/2012	0,0239	0,0144	0,0158	0,0043	0,0057	0,0007	0,0014		0,0021	0,0021	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000
A/Novosibirsk/23k/2012	0,0254	0,0158	0,0173	0,0057	0,0071	0,0021	0,0028	0,0014		0,0000	0,0042	0,0021	0,0021	0,0021
A/Novosibirsk/26k/2012	0,0254	0,0158	0,0173	0,0057	0,0071	0,0021	0,0028	0,0014	0,0000		0,0042	0,0021	0,0021	0,0021
A/Novosibirsk/59d/2012	0,0247	0,0151	0,0166	0,0050	0,0064	0,0014	0,0021	0,0007	0,0021	0,0021		0,0021	0,0021	0,0021
A/Novosibirsk/155/2012	0,0247	0,0151	0,0166	0,0050	0,0064	0,0000	0,0021	0,0007	0,0021	0,0021	0,0014		0,0000	0,0000
A/Krasnoyarsk/10/2012	0,0239	0,0144	0,0158	0,0043	0,0057	0,0007	0,0014	0,0000	0,0014	0,0014	0,0007	0,0007		0,0000
A/Tyumen/03/2012	0,0254	0,0158	0,0173	0,0057	0,0072	0,0021	0,0028	0,0014	0,0028	0,0028	0,0021	0,0021	0,0014	
	Нуклеотидные последовательности													

Выявлена идентичность (дистанции равны 0,0000) значительной части последовательностей NA на аминокислотном уровне:

- 1) Для штаммов A/Novosibirsk/23k/2012 и A/Novosibirsk/26k/2012.
- 2) Для штаммов A/Novosibirsk/13/2012, A/Novosibirsk/22/2012, A/Novosibirsk/155/2012, A/Krasnoyarsk/10/2012 и A/Tyumen/03/2012.

Примечательно, что штаммы из второй группы изолированы в разных городах Сибири. Дистанции же между остальными штаммами (за исключением A/Novosibirsk/02d/2012, который отличается от остальных штаммов эпидемического сезона) лежат в интервале 0,0021 - 0,0063 со средним значением  $0,0032 \pm 0,0014$ .

Из совокупности исследованных штаммов, как по нуклеотидной, так и по аминокислотной последовательности NA выделяется штамм A/Novosibirsk/02d/2012, который наиболее дистанцирован от остальных штаммов эпидемического сезона 2011-2012 гг. и может быть отнесен к другой генетической подгруппе. Генетические дистанции между A/Novosibirsk/02d/2012 и остальными исследованными штаммами составляют от 0,0057 до 0,0072 (среднее значение  $0,0066 \pm 0,0007$ ), на аминокислотном уровне попарные дистанции составляют 0,0042 и 0,0063 (в зависимости от пары последовательностей) со средним значением  $0,0049 \pm 0,0010$ .

Изменение дистанций между исследованными изолятами и вакцинными штаммами (от наиболее антигенно-отличного A/Wisconsin/67/2005 до антигенно-родственного A/Victoria/361/2011) соответствует изменчивости циркулировавших штаммов вируса гриппа и появлению дрейфовых вариантов.

Генетические дистанции между исследованными изолятами и штаммом A/Victoria/361/2011 превышают значения дистанций в пределах пула исследованных российских штаммов, что свидетельствует о накоплении мутаций в NA относительно этого штамма, при незначительной вариабельности последовательностей NA штаммов, изолированных в конкретном географическом регионе.

Согласно анализу аминокислотных замен в нейраминидазе (табл. 15), обнаружено 8 замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих в большинстве последовательностей, 4 спорадических замены в отдельных штаммах и замена T9S, обнаруженная в двух штаммах из 10.

За исключением A/Novosibirsk/02d/2012 штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. содержат по 6 замен в NA, общих с актуальным вакцинным штаммом A/Victoria/361/2011 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма A/Perth/16/2009. Все исследованные штаммы содержат замены K258E и N329T, отличающие их от актуального вакцинного штамма

A/Victoria/361/2011, а штаммы A/Novosibirsk/23k/2012 и A/Novosibirsk/26k/2012, кроме того, содержат замену T9S.

В целом, можно отметить незначительную вариабельность (вплоть до полной идентичности) паттернов изменчивости нейраминидазы штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в азиатской части РФ в эпидемическом сезоне 2011-2012 гг.

Наличие замен T9S, K258E, T329N, а также спорадических замен в NA отдельных штаммов указывает на то, что исследованные российские штаммы по структуре NA представляют собой дрейфовые варианты, относительно актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011.

Наличие ключевых аминокислотных замен (WHO, 2011) S367N, K369T и I464L позволяет отнести исследованные штаммы по структуре нейраминидазы к генетической кладе Victoria/208, а замены L81P и N402D характерны для генетических подгрупп 3С и 3В этой клады. Исходя из наличия замены D93G нейраминидаза исследованных штаммов эпидемического сезона 2011-2012, кроме штамма A/Novosibirsk/02d/2012, относится к генетической подгруппе клады 3С, а нейраминидаза штамма A/Novosibirsk/02d/2012 – к генетической подгруппе 3В клады Victoria/208.

Таблица 15. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены, общие со штаммом A/Victoria/361/2011, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	9	81	93	216	258	329	367	369	402	464	469
A/Perth/16/2009	T	L	D	V	E	N	S	K	N	I	I
A/Victoria/361/2011		P	G		K	T	N	T	D	L	
A/Novosibirsk/02d/2012		P					N	T	D	L	M
A/Novosibirsk/13/2012		P	G				N	T	D	L	
A/Novosibirsk/16/2012		P	G				N	T	D	L	V
A/Novosibirsk/22/2012		P	G				N	T	D	L	
A/Novosibirsk/23k/2012	S	P	G				N	T	D	L	
A/Novosibirsk/26k/2012	S	P	G				N	T	D	L	
A/Novosibirsk/59d/2012		P	G	A			N	T	D	L	
A/Novosibirsk/155/2012		P	G				N	T	D	L	
A/Krasnoyarsk/10/2012		P	G				N	T	D	L	
A/Tyumen/03/2012		P	G				N	T	D	L	

Аминокислотные замены S367N и K369T относительно предыдущего вакцинного штамма A/Perth/16/2009 во всех исследованных изолятах эпидемического сезона 2011-2012 привели к приобретению потенциального сайта гликозилирования NET<sub>367-369</sub>, а замена N402D привела к элиминированию потенциального сайта гликозилирования NRS<sub>402-404</sub>. Кроме того, замена T329N относительно актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011 обусловила

приобретение потенциального сайта гликозилирования NDS<sub>329-331</sub> у всех исследованных штаммов.

### **Эпидемический сезон 2012-2013**

Актуальным вакцинным штаммом являлся A/Victoria/361/2011, уже включенный в матрицу попарных дистанций для оценки дистанций между штаммами предыдущего эпидемического сезона. Таким образом, попарные дистанции между использованными в анализе последовательностями NA вакцинных штаммов различных эпидемических сезонов также были неизменны и значения приведенные выше для сезона 2011-2012 гг. также верны и для сезона 2012-2013 (табл. 16).

Две пары последовательностей NA идентичны на нуклеотидном уровне (генетические дистанции равны 0,0000): пара A/Novosibirsk/76/2012 - A/Novosibirsk/3k/2013 и пара A/Novosibirsk/77d/2012 - A/Novosibirsk/88d/2012. Кроме двух пар изолятов, пул исследованных штаммов вируса гриппа А(Н3N2) характеризуется гетерогенностью (дистанции составляют от 0,0007 до 0,0050, со средним значением  $0,0025 \pm 0,0013$ ) по первичной структуре гена, кодирующего нейраминидазу.

Показана идентичность (дистанции равны 0,0000) значительной части последовательностей NA на аминокислотном уровне: A/Novosibirsk/3k/2013, A/Novosibirsk/04/2013, A/Novosibirsk/77d/2012, A/Novosibirsk/88d/2012, A/Omsk/25/2013, A/Krasnoyarsk/963/2013, A/Novosibirsk/76/2013 и A/Novosibirsk/77/2013. Примечательно, что штаммы, идентичные по первичной структуре нейраминидазы, были изолированы в разных населенных пунктах, разделенных значительными расстояниями: г. Новосибирск, пос. Кольцово (Новосибирская область), с. Довольное (Новосибирская область), г. Омск и г. Красноярск. Для остальных российских штаммов попарные дистанции на аминокислотном уровне составляют 0.0021 и 0.0042 (в зависимости от пары последовательностей), со средним значением  $0,0023 \pm 0,0007$ . В целом, в пределах эпидемического сезона, по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям NA исследованные штаммы незначительно (по сравнению с расстояниями от вакцинных штаммов) дистанцированы друг от друга.

Изменение дистанций между исследованными изолятами и вакцинными штаммами (от наиболее антигенно-отличного A/Wisconsin/67/2005 до антигенно-родственного актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011) соответствует изменчивости циркулировавших штаммов вируса гриппа и появлению дрейфовых вариантов. Так, средняя генетическая дистанция от штамма A/Wisconsin/67/2005 составляет  $0,0260 \pm 0,0009$ , от A/Brisbane/10/2007 -  $0,0165 \pm 0,0009$ , от A/Perth/16/2009 -  $0,0180 \pm 0,0009$  и от A/Victoria/361/2011 -  $0,0060 \pm 0,0009$ . На аминокислотном уровне дистанции соответственно  $0,0323 \pm 0,0010$ ,  $0,0195 \pm 0,0009$ ,  $0,0132 \pm 0,0009$  и  $0,0044 \pm 0,0011$ .

Таблица 16. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг.

	A/Wisconsin/67/2005	A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Victoria/361/2011	A/Novosibirsk/3k/2013	A/Novosibirsk/04/2013	A/Novosibirsk/77d/2013	A/Novosibirsk/88d/2013	A/Omsk/25/2013	A/Omsk/44/2013	A/Krasnoyarsk/919/2013	A/Krasnoyarsk/963/2013	A/Novosibirsk/76/2013	A/Novosibirsk/77/2013	A/Novosibirsk/79/2013
	Аминокислотные последовательности														
A/Wisconsin/67/2005		0,0189	0,0210	0,0361	0,0318	0,0318	0,0318	0,0318	0,0318	0,0339	0,0339	0,0318	0,0318	0,0318	0,0339
A/Brisbane/10/2007	0,0122		0,0063	0,0232	0,0189	0,0189	0,0189	0,0189	0,0189	0,0211	0,0210	0,0189	0,0189	0,0189	0,0211
A/Perth/16/2009	0,0165	0,0071		0,0168	0,0126	0,0126	0,0126	0,0126	0,0126	0,0147	0,0147	0,0126	0,0126	0,0126	0,0147
A/Victoria/361/2011	0,0283	0,0187	0,0202		0,0042	0,0042	0,0042	0,0042	0,0042	0,0063	0,0063	0,0042	0,0042	0,0042	0,0021
A/Novosibirsk/3k/2013	0,0268	0,0173	0,0187	0,0071		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021
A/Novosibirsk/04/2013	0,0261	0,0165	0,0180	0,0064	0,0007		0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021
A/Novosibirsk/77d/2013	0,0246	0,0151	0,0165	0,0050	0,0021	0,0014		0,0000	0,0000	0,0021	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021
A/Novosibirsk/88d/2013	0,0246	0,0151	0,0165	0,0050	0,0021	0,0014	0,0000		0,0000	0,0021	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021
A/Omsk/25/2013	0,0268	0,0173	0,0187	0,0071	0,0043	0,0036	0,0021	0,0021		0,0021	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021
A/Omsk/44/2013	0,0276	0,0180	0,0194	0,0064	0,0050	0,0043	0,0028	0,0028	0,0050		0,0042	0,0021	0,0021	0,0021	0,0042
A/Krasnoyarsk/919/2013	0,0261	0,0165	0,0180	0,0064	0,0036	0,0028	0,0014	0,0014	0,0036	0,0043		0,0021	0,0021	0,0021	0,0042
A/Krasnoyarsk/963/2013	0,0253	0,0158	0,0173	0,0057	0,0014	0,0007	0,0007	0,0007	0,0028	0,0036	0,0021		0,0000	0,0000	0,0021
A/Novosibirsk/76/2013	0,0268	0,0173	0,0187	0,0071	0,0000	0,0007	0,0021	0,0021	0,0043	0,0050	0,0036	0,0014		0,0000	0,0021
A/Novosibirsk/77/2013	0,0268	0,0173	0,0187	0,0057	0,0014	0,0007	0,0021	0,0021	0,0043	0,0036	0,0036	0,0014	0,0014		0,0021
A/Novosibirsk/79/2013	0,0253	0,0158	0,0172	0,0043	0,0028	0,0021	0,0007	0,0007	0,0028	0,0036	0,0021	0,0014	0,0028	0,0028	
	Нуклеотидные последовательности														

Согласно анализу аминокислотных замен (табл. 17), в нейраминидазе обнаружено 8 замен (относительно предыдущего и актуального вакцинных штаммов), присутствующих во всех исследованных последовательностях и 3 спорадических замены в отдельных штаммах.

Таблица 17. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг.. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены, общие со штаммом A/Victoria/361/2011.

	81	93	141	221	258	329	367	369	402	464
A/Perth/16/2009	L	D	N	E	E	N	S	K	N	I
A/Victoria/361/2011	P	G			K	T	N	T	D	L
A/Novosibirsk/3k/2013	P	G					N	T	D	L
A/Novosibirsk/04/2013	P	G					N	T	D	L
A/Novosibirsk/77d/2012	P	G					N	T	D	L
A/Novosibirsk/88d/2012	P	G					N	T	D	L
A/Omsk/25/2013	P	G					N	T	D	L
A/Omsk/44/2013	P	G	D				N	T	D	L
A/Krasnoyarsk/919/2013	P	G		D			N	T	D	L
A/Krasnoyarsk/963/2013	P	G					N	T	D	L
A/Novosibirsk/76/2012	P	G					N	T	D	L
A/Novosibirsk/77/2012	P	G					N	T	D	L
A/Novosibirsk/79/2012	P	G				T	N	T	D	L

Штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. содержат по 6 замен в NA, общих с актуальным вакцинным штаммом A/Victoria/361/2011 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма A/Perth/16/2009. Аминокислотные замены K258E и T329N отличают рассматриваемые последовательности от NA актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011.

В целом, по паттерну распределения аминокислотных замен, пул штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ в эпидемический сезон 2012-2013 гг., характеризуется низкой степенью вариабельности первичной структуры белка NA.

Наличие ключевых аминокислотных замен (WHO, 2012) S367N, K369T и I464L позволяет отнести исследованные штаммы по структуре нейраминидазы к генетической кладе Victoria/208, а замены L81P и N402D характерны для генетических подгрупп 3С и 3В этой клады. Исходя из наличия замены D93G, по первичной структуре нейраминидазы исследованные штаммы эпидемического сезона 2012-2013 относятся к генетической подгруппе клады 3С клады Victoria/208.

Аминокислотные замены в пределах потенциальных сайтов гликозилирования были схожи с изменениями, обнаруженными в штаммах предыдущего эпидемического сезона. Замены S367N и K369T относительно предыдущего вакцинного штамма A/Perth/16/2009 во всех исследованных изолятах эпидемического сезона 2012-2013 привели к приобретению

потенциального сайта гликозилирования NET<sub>367-369</sub>, а замена N402D привела к элиминированию потенциального сайта гликозилирования NRS<sub>402-404</sub>. Замена T329N относительно актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011 обусловила приобретение потенциального сайта гликозилирования NDS<sub>329-331</sub> у исследованных штаммов (кроме штамма A/Novosibirsk/79/2012).

### **3.1.3 Динамика изменчивости поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.**

#### **Изменчивость первичной структуры белка НА**

Именно аминокислотная изменчивость составляет основу антигенного дрейфа, который приводит к необходимости изменять состав противогриппозных вакцин. По этой причине важным является анализ изменчивости и филогенетических связей штаммов вируса гриппа не только в пределах отдельных эпидемических сезонов, но и в динамике за более протяженный временной период.

За четыре эпидемических сезона с 2008 по 2013 гг. обнаружено 26 позиций в гемагглютанине, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинных штаммов (начиная со штамма A/Brisbane/10/2007), при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. исключены штаммспецифичные замены) (табл. 18). Исходя из того, что замены в положения 156, 186 и 214 характерны для всех исследованных штаммов и отличают их от вакцинных штаммов A/Perth/16/2009 и A/Victoria/361/2011, то эти замены можно исключить из анализа изменчивости непосредственно российских штаммов (учитывая их при оценке дрейфа от актуальных вакцинных штаммов). Таким образом, замены происходили по 23 позициям.

Из 23 позиций аминокислотных замен - 20 обнаружено в субъединице НА1 (антигенно активная субъединица), а из них 17 – в антигенных сайтах, т.е. вероятно, замены именно в этих положениях ассоциированы с изменением антигенных свойств вирусов.

Рассматривая динамику появления характерных (встречающихся в нескольких штаммах) для отдельных эпидемических сезонов аминокислотных замен в НА, можно отметить, что в пределах отдельных сезонов паттерны распределения замен характеризуются низкой вариабельностью.



Таблица 18. Позиции в HA, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинных штаммов, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов. Светло-серый цвет - замены, появившиеся после пандемии и закрепившиеся на 2 и более эпидемических сезона, темно-серый цвет - замены, появившиеся до пандемии A(H1N1) pdm09 и сохранившиеся после, оранжевый цвет – замены в вакцинных штаммах, не встречающиеся в других рассмотренных штаммах. Красным, зеленым, синим, желтым, фиолетовым цветами выделены антигенные сайты.

Антигенный сайт	HA1																								HA2		
	C	C	C	E	B	A	A	A	B	B		D	B	B	B	D	D		E	E	C	C					
	33	45	48	50	62	128	142	144	145	158	156	162	173	186	189	198	212	214	223	260	261	278	312	*	347	361	428
<b>A/Brisbane/10/2007</b>	Q	S	T	E	E	T	R	N	N	K	H	P	K	G	N	A	T	I	V	I	R	N	N	*	V	I	L
A/Novosibirsk/31/2009													Q											*		R	
A/Novosibirsk/319/2009													Q											*		R	
A/Novosibirsk/628/2009													Q											*		R	
A/Novosibirsk/707/2009													Q											*		R	
A/Novosibirsk/1211/2009					G								Q											*		R	
<b>A/Perth/16/2009</b>					K			K		N			Q		K			S						*		R	
A/Novosibirsk/76K/2011				K	K			K		N		S	Q		K					M	Q			*		R	
A/Novosibirsk/1832/2011				K	K			K		N		S	Q		K					M	Q			*		R	
A/Novosibirsk/1927/2011				K	K			K		N		S	Q		K					M	Q			*		R	
<b>A/Victoria/361/2011</b>		N	I							N	R		Q	V	K	S	A		I				S	*		R	
A/Novosibirsk/02d/2012									S	N			Q		K	S	A		I				S	*		R	
A/Novosibirsk/13/2012	R	N	I			N				N			Q		K	P	A		I			K	S	*		R	
A/Novosibirsk/16/2012	R	N	I			N				N			Q		K	P	A		I			K	S	*		R	
A/Novosibirsk/22/2012	R	N	I			N				N			Q		K	P	A		I			K	S	*		R	
A/Novosibirsk/23k/2012	R	N	I							N			Q		K	S	A		I			K	S	*		R	I
A/Novosibirsk/26k/2012	R	N	I							N			Q		K	S	A		I			K	S	*		R	I
A/Novosibirsk/59d/2012	R	N	I			N				N			Q		K	P	A		I			K	S	*		R	
A/Novosibirsk/155/2012	R	N	I			N				N			Q		K	P	A		I			K	S	*		R	
A/Krasnoyarsk/10/2012	R	N	I			N				N			Q		K	P	A		I			K	S	*		R	
A/Tyumen/03/2012	R	N	I							N			Q		K	S	A		I			K	S	*		R	
A/Novosibirsk/3k/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I	M		K	S	*	M	R	
A/Novosibirsk/04/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I	M		K	S	*	M	R	
A/Novosibirsk/77d/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I			K	S	*		R	
A/Novosibirsk/88d/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I			K	S	*		R	
A/Omsk/25/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I			K	S	*		R	
A/Omsk/44/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I			K	S	*		R	
A/Krasnoyarsk/919/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I			K	S	*		R	
A/Krasnoyarsk/963/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I	M		K	S	*	M	R	
A/Novosibirsk/76/2013		N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I	M		K	S	*	M	R	
A/Novosibirsk/77/2013	R	N	I			A	G			S	N		Q		K	S	A		I	M		K	S	*	M	R	
A/Novosibirsk/79/2013	R	N	I			A	G			N			Q		K	S	A		I	M		K	S	*		R	

Из 23 позиций аминокислотных замен в HA1 – четыре (62, 128, 198 и 260) являются наиболее вариабельными. За 4 эпидемических сезона именно для этих положений оказались характерными наибольшее число или частота замен.

Замена N145S, обнаруженная в штамме эпидемического сезона 2011-2012 гг. и классифицированная как спорадическая, в эпидемическом сезоне 2012-2013 была выявлена в большинстве исследованных штаммов (10 из 11). Аминокислоты Q33, S45 и T48 сохранялись в вирусной популяции на протяжении двух эпидемических сезонов и затем были элиминированы в результате замен Q33R, S45N и T48I, но обнаружались в отдельных штаммах эпидемических сезонов 2011-2012 и 2012-2013 гг.

По паттерну аминокислотных замен из всего пула изученных последовательностей выделяются HA штаммов, изолированных в эпидемический сезон 2010-2011 гг. Именно в этих последовательностях обнаружено наибольшее количество замен (E50K, E62K, N144K, P162S и R261Q), не встречающихся в других эпидемических сезонах. Из 8 аминокислотных замен, впервые (с 2008 г.) обнаруженных именно в штаммах эпидемического сезона 2010-2011, всего 3 замены (K158N, N189K, I260M) встречались в дальнейшем.

Для штаммов остальных эпидемических сезонов не характерно резкого изменения в паттерне аминокислотных замен – изменение первичной структуры HA происходит последовательно, с сохранением большинства замен, появившихся в предыдущих сезонах. Вероятно, оказываются значимыми и закрепляются в популяции замены, обуславливающие изменение антигенных свойств вируса. Так, большинство выявленных аминокислотных замен обнаруживается на протяжении нескольких сезонов.

Исходя из оценки количества аминокислотных замен, общих между HA штаммов, изолированных в разные эпидемические сезоны, можно отметить более близкое родство штаммов эпидемического сезона 2011-2012 гг. со штаммами сезона 2008-2009 (предпандемический сезон), нежели со штаммами постпандемического сезона 2010-2011.

Кроме того, можно проследить корреляцию между изменением в составе вакцины и накоплением аминокислотных замен. По первичной структуре HA1 штаммы, изолированные в течение эпидемических сезонов 2008-2009 и 2010-2011 гг. отличаются 8 аминокислотными заменами, что и привело к смене вакцинного штамма. Субъединицы HA1 штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг. отличаются по 15 аминокислотным остаткам, что также коррелирует со сменой вакцинного штамма. Большая часть штаммов, выделенных в эпидемические сезоны 2011-2012 и 2012-2013 гг., по первичной структуре HA1 отличаются пятью аминокислотными заменами и, согласно рекомендациям ВОЗ по составу вакцины – этих замен оказалось недостаточно, чтобы радикально поменять антигенные свойства вирусов.

Использование 3D-моделирования позволяет получить представление о пространственной локализации аминокислотных замен (Рис. 13).

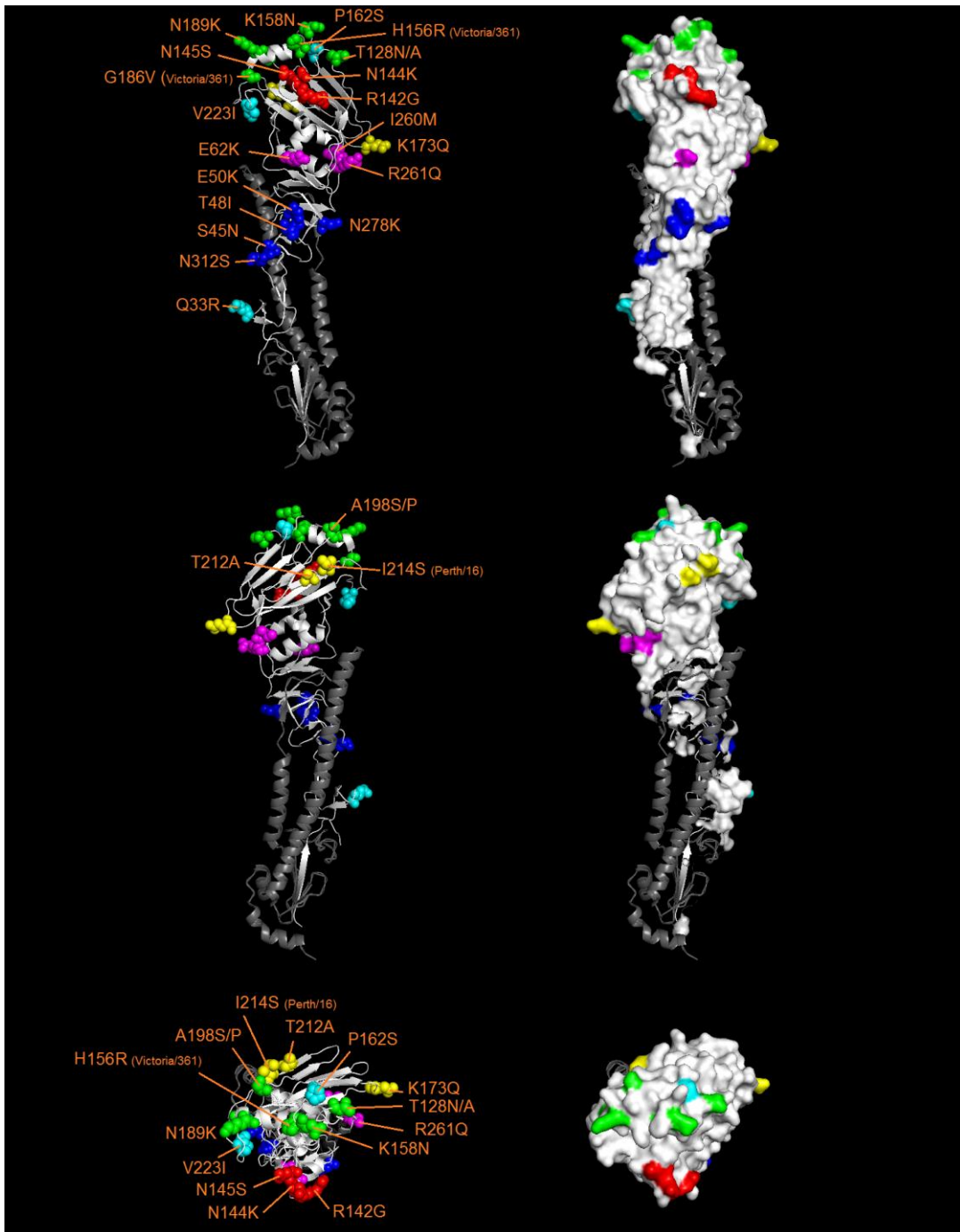


Рисунок 13. Аминокислотные замены в HA1 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. Название вакцинного штамма в скобках указывает на аминокислотную замену, встречающуюся только в этом штамме и не обнаруженную в HA других штаммов. Различные цвета указывают на принадлежность мутаций к отдельным антигенным сайтам: красный – А, зеленый – В, синий – С, желтый – D, фиолетовый – Е, голубой – позиция аминокислотной замены не относится к антигенным сайтам.

Согласно пространственной модели, все аминокислотные замены в субъединице HA1 локализованы на поверхности. Такое расположение закономерно характерно для мутаций в

антигенных сайтах. В данном же случае, поверхностная локализация выявлена не только для аминокислотных замен, расположенных в антигенных сайтах, но и для замен к ним не относящихся.

Таким образом, все замены, отмеченные на пространственных моделях (т.е., встречающиеся в двух и более исследованных штаммах) потенциально могут оказывать влияние на антигенные характеристики вирусов.

### Филогенетический анализ и анализ эволюционных дистанций между последовательностями HA

Для визуализации изменчивости структуры гемагглютинина на аминокислотном уровне была построена филогенетическая дендрогрaмма (рис. 14).

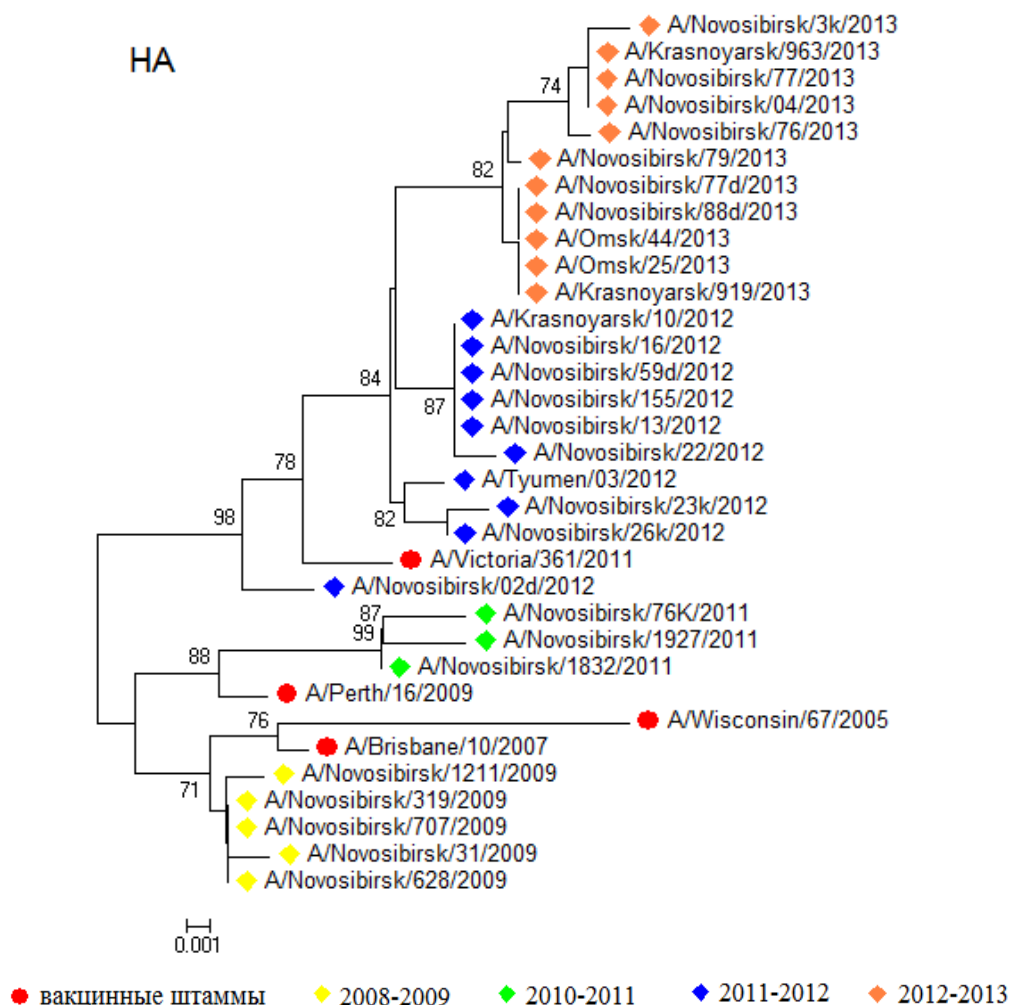


Рисунок 14. Дендрогрaмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей HA штаммов вируса гриппа A(H3N2), изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. и вакцинных штаммов соответствующих эпидемических сезонов.

По структуре филогенетического дерева видно, что все последовательности на аминокислотном уровне подразделяются на две основные крупные филогенетические ветви:

- 1) Группы штаммов, относящихся к кладам A/Brisbane/10 и A/Perth/16.

## 2) Штаммы, относящиеся к кладе A/Victoria/208

Последовательности, родственные вакцинным штаммам A/Brisbane/10/2007 и A/Perth/16/2009, хотя и относятся к одной крупной ветви филогенетического дерева – формируют две отдельные группы.

Филогенетическая удаленность от вакцинных штаммов, но при этом близость штаммов в пределах отдельных эпидемических сезонов, указывают на антигенный дрейф вирусной популяции – т.е. на накопление одинаковых аминокислотных замен, обуславливающих уход вирусов от иммунного ответа со стороны организма-хозяина.

Последовательное (в пределах одной генетической клады) изменение паттерна аминокислотных замен характерно только между сезонами 2011-2012 и 2012-2013 гг., что коррелирует с сохранением штамма A/Victoria/361/2011 в составе вакцины. В остальных случаях: между эпидемическими сезонами 2008-2009 и 2010-2011 гг, а также 2011-2012 гг. происходила смена циркулировавшей клады вирусов гриппа А(Н3N2).

Обнаруженный характер филогенетических связей (удаленность исследованных штаммов разных эпидемических сезонов, смена циркулировавших клад, выраженный антигенный дрейф в пределах отдельных генетических клад) указывает на то, что сезонная циркуляция вируса гриппа А(Н3N2) на территории азиатской части РФ обуславливается множественными заносами вирусов извне.

Для комплексной оценки изменчивости штаммов различных сезонов относительно друг друга, а также относительно вакцинных штаммов, были построены матрицы попарных дистанций (на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей). Результаты представлены в виде «тепловых карт» (рис. 15).

В пределах отдельных эпидемических сезонов показано сходство нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА большинства штаммов (за исключением штамма A/Novosibirsk/02d/2012) эпидемического сезона 2011-2012 гг., который отличается от остальных штаммов эпидемического сезона и, согласно анализу аминокислотных замен, относится к другой генетической подгруппе.

При анализе дистанций между последовательностями НА штаммов разных эпидемических сезонов обнаружено, что штаммы постпандемического сезона 2010-2011 гг. значительно отличаются от штаммов двух последующих сезонов: средние значения дистанций составляют по нуклеотидным последовательностям  $0,0230 \pm 0,0012$  и  $0,0265 \pm 0,0011$ , а по аминокислотным -  $0,0296 \pm 0,0026$  и  $0,0332 \pm 0,0022$ . При этом дистанции между НА штаммов допандемического сезона 2008-2009 гг. и сезонов 2010-2011, 2011-2012 гг. схожи. Т.е. по структуре НА штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. генетически равноудалены от штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг.

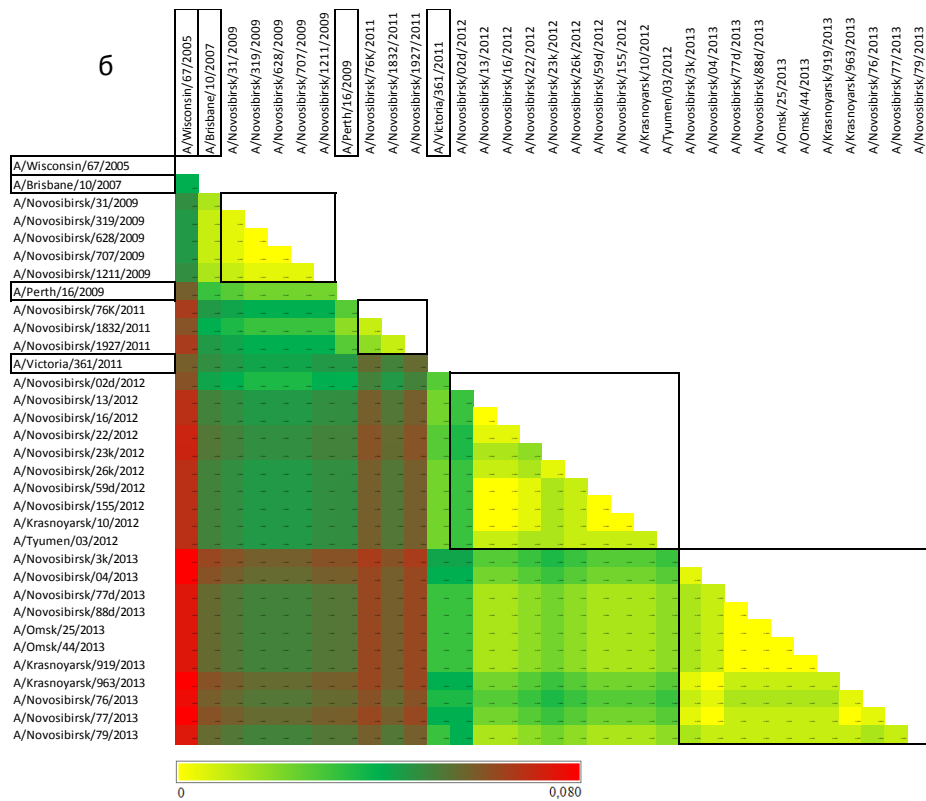
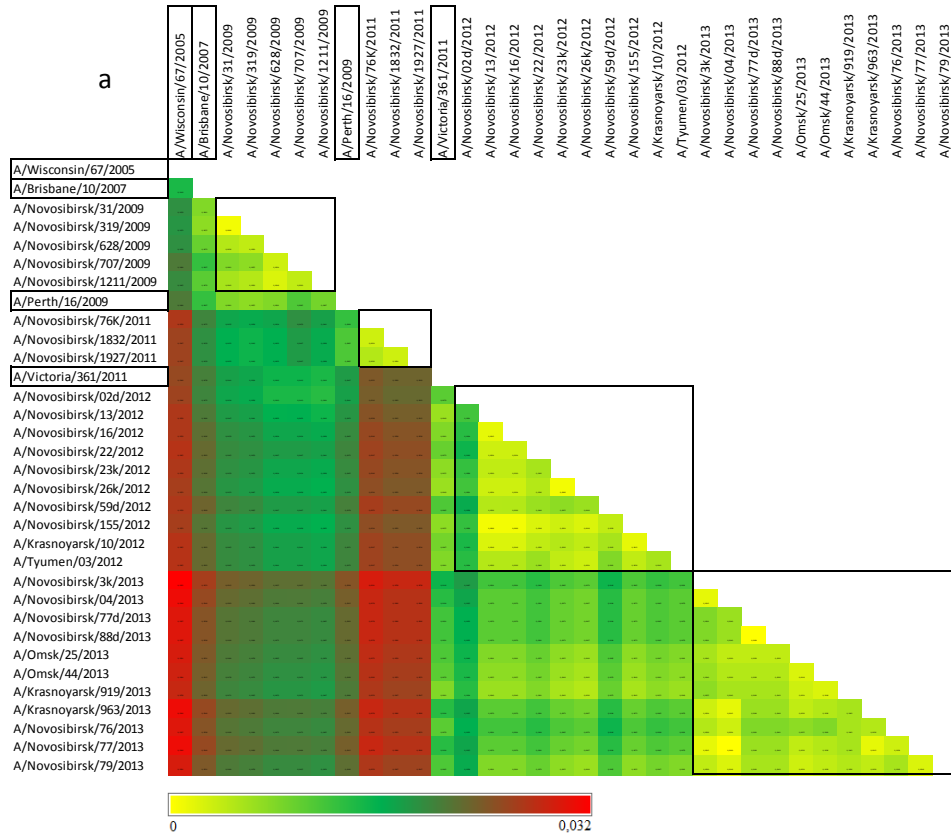


Рисунок 15. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями НА штаммов вируса гриппа А(Н3N2).

Одним из методов анализа последовательностей является построение филогенетических сетей. Нами были построены филогенетические сети на основе нуклеотидных последовательностей HA и NA штаммов вирусов гриппа А и В, изолированных в азиатской части РФ, а также вакцинных штаммов различных эпидемических сезонов (рис. 16). Анализ методом филогенетических сетей позволяет наглядно представить группы схожих последовательностей и визуально оценить различия между ними.

Можно отметить, что штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. наиболее дистанцированы от остальных исследованных изолятов, как от предпандемических, так и от постпандемических. Это указывает на то, что эти и близкородственные им штаммы появились при пандемии вируса гриппа А(H1N1) pdm09, но затем перестали циркулировать или же изменились в результате значительного генетического дрейфа, который привел к масштабным изменениям в паттерне аминокислотных замен.

HA штаммов, выделенных в эпидемические сезоны 2010-2011 гг, 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг., образуют компактные группы схожих последовательностей (исключение составляет штамм A/Novosibirsk/02d/2012). Пул HA штаммов сезона 2008-2009 гг. характеризуются наибольшей гетерогенностью.

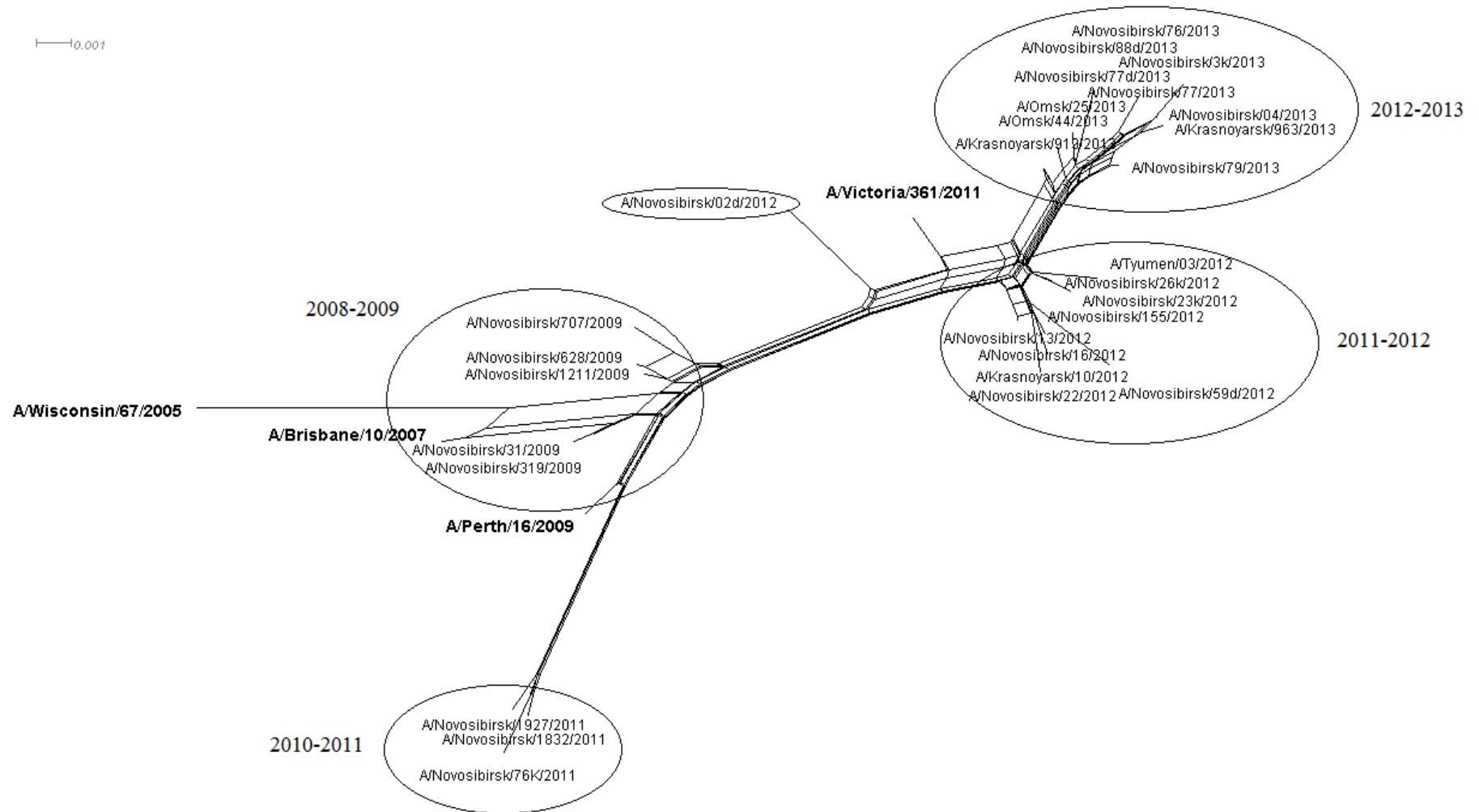


Рисунок 16 - Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих НА штаммов вируса гриппа А/Н3N2, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2012 гг., а также вакцинных штаммов.



Исходя из того, что классическим и повсеместно используемым методом представления разнообразия и изменчивости вирусной популяции является построение филогенетических деревьев, то этот метод был использован для отражения эволюционных взаимосвязей между штаммами вируса гриппа (рис. 17). Для построения филогенетических дендрограмм были использованы нуклеотидные последовательности сегментов генома, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории азиатской части РФ, а также вакцинных штаммов разных эпидемических сезонов и штаммов, изолированных на территории других стран (первичные структуры генов доступны в международной базе данных GenBank).

Филогенетически штаммы сезона 2008-2009 разделены на 2 группы и значительно разнесены на дендрограмме. Такой характер филогенетических связей позволяет предположить, что в эпидемический сезон 2008-2009 гг. штаммы вируса гриппа были занесены на территорию азиатской части РФ как минимум из двух источников. Кроме того, филогенетическая удаленность исследованных штаммов от актуального на тот момент вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007 указывает на наличие генетической изменчивости относительно штамма, входящего в состав вакцины. Исходя из того, что по паттерну аминокислотных замен в НА штаммы сезона 2008-2009 схожи не только между собой, но и с вакцинным штаммом A/Brisbane/10/2007, можно заключить, что филогенетическая удаленность, главным образом, обуславливается синонимичными заменами в соответствующем сегменте генома вируса.

Штаммы эпидемического сезона 2010-2011, выделенные на территории азиатской части РФ, хотя по первичной структуре гена НА и принадлежат генетической кладе A/Perth/16 - генетически отдалены от вакцинного штамма и локализованы на другой ветви филогенетического дерева. Согласно филогенетическому анализу, в пределах эпидемического сезона 2010-2011 исследованные штаммы близкородственны между собой, а также близки к штаммам, выделенным на территории Норвегии, Нидерландов, Японии и Китая. Из этого можно заключить, что, вероятно, в результате пандемии вируса гриппа А(Н1N1) pdm09 появился пул штаммов вируса гриппа А(Н3N2), характеризующийся низкой гетерогенностью структуры НА.

Штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2011-2012 гг., относятся к генетической кладе A/Victoria/208. При этом рассматриваемые последовательности локализованы на разной степени отдаленности ветвях филогенетического дерева. Штамм A/Novosibirsk/02d/2012 наиболее отдален от остальных штаммов сезона и относится к другой генетической группе клады A/Victoria/208. Остальные исследованные штаммы образуют 2 группы, в которые, в том числе, входят как другие российские изоляты вируса гриппа А(Н3N2), так и штаммы, выделенные на территории других стран.



Рисунок 17. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих НА штаммов вируса гриппа А(Н3N2). Круглые маркеры – вакцинные штаммы. Ромбовидные маркеры – исследованные штаммы.

Таким образом, выявленные филогенетические различия между исследованными штаммами указывают на то, что в эпидемический сезон 2011-2012 гг. вирус гриппа был занесен на территорию азиатской части РФ из нескольких источников извне. Кроме того, рассматриваемые последовательности относятся к ветвям филогенетического дерева,

отдельным от штамма A/Victoria/361/2011, что свидетельствует о генетическом дрейфе относительно вакцинного штамма.

Штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2012-2013 гг., относятся к генетической кладе A/Victoria/208, но образуют филогенетическую группу за пределами ветви филогенетического дерева, к которой принадлежит вакцинный штамм A/Victoria/361/2011. Рассматриваемые последовательности представляют собой результат продолжающегося генетического дрейфа относительно актуального вакцинного штамма.

Исходя из характера филогенетических связей (образование локальных филогенетических групп, протяженные дистанции между штаммами) рассматриваемых последовательностей НА эпидемического сезона 2012-2013 гг., можно, также как и в предыдущие сезоны, предположить множественные заносы вируса гриппа в регионы, где осуществлялся сбор клинического материала.

#### **Антигенный анализ штаммов вируса гриппа А(Н3N2)**

Серологический анализ антигенных свойств исследуемых штаммов проводили в реакции торможения гемагглютинации с использованием референс-сывороток (табл. 18).

Штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. антигенно схожи с соответствующим вакцинным штаммом A/Brisbane/10/2007. При этом, для них характерна кросс-реактивность (хотя и сниженная) с сывороткой к следующему вакцинному штамму A/Perth/16/2009. Исходя из анализа аминокислотных замен, можно предположить, что торможение гемагглютинации в реакции с сывороткой к A/Perth/16/2009 может быть связано с заменой K173Q в антигенном сайте D. Именно эта замена является общей для штаммов эпидемического сезона 2008-2009 гг. и A/Perth/16/2009 и отличает их от штамма A/Brisbane/10/2007.

Штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. A/Novosibirsk/76k/2011, A/Novosibirsk/1832/2011 и A/Novosibirsk/1927/2011 не проявляют кросс-реактивности с сывороткой к предыдущему вакцинному штамму A/Brisbane/10/2007 и антигенно подобны актуальному вакцинному штамму A/Perth/16/2009, что коррелирует с наличием характерных аминокислотных замен. Кроме того, эти штаммы антигенно близки к штамму A/Victoria/361/2011, что может быть связано с мутациями K158N и N189K в антигенном сайте В.

В течение эпидемического сезона 2011-2012 гг. в состав вакцины еще входил штамм A/Perth/16/2009, но циркулировавшие штаммы уже генетически и антигенно отличались от него и были схожи со штаммом A/Victoria/361/2011. Из-за обилия аминокислотных замен в НА штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг. затруднительно даже предполагать, какие конкретно мутации могли привести к различиям в антигенных характеристиках.

Таблица 19. Сравнительный анализ антигенных свойств штаммов вируса гриппа А(Н3N2). РТГА с хорьковыми референс-сыворотками и эритроцитами морской свинки.

		A/Brisbane/10/2007	A/Perth/16/2009	A/Victoria/361/2011
	A/Brisbane/10/2007	<b>1280</b>	40	160
	A/Perth/16/2009	20	<b>640</b>	640
	A/Victoria/361/2011	80	80	<b>1280</b>
2008-2009	A/Novosibirsk/31/2009	1280	160	40
	A/Novosibirsk/319/2009	1280	160	80
	A/Novosibirsk/628/2009	1280	320	80
	A/Novosibirsk/707/2009	1280	160	40
	A/Novosibirsk/1211/2009	1280	320	40
2010-2011	A/Novosibirsk/76K/2011	20	640	1280
	A/Novosibirsk/1832/2011	40	640	1280
	A/Novosibirsk/1927/2011	40	1280	1280
2011-2012	A/Novosibirsk/02d/2012	80	160	320
	A/Novosibirsk/13/2012	20	320	1280
	A/Novosibirsk/16/2012	20	320	1280
	A/Novosibirsk/22/2012	160	160	160
	A/Novosibirsk/23k/2012	160	80	320
	A/Novosibirsk/26k/2012	40	40	160
	A/Novosibirsk/59d/2012	20	160	1280
	A/Novosibirsk/155/2012	20	160	2560
	A/Krasnoyarsk/10/2012	40	80	1280
A/Tyumen/03/2012	20	160	640	
2012-2013	A/Novosibirsk/3k/2013	40	40	160
	A/Novosibirsk/04/2013	40	40	160
	A/Novosibirsk/77d/2013	80	40	320
	A/Novosibirsk/88d/2013	80	40	320
	A/Omsk/25/2013	80	40	320
	A/Omsk/44/2013	80	40	320
	A/Krasnoyarsk/919/2013	40	40	160
	A/Krasnoyarsk/963/2013	40	40	160
	A/Novosibirsk/76/2013	40	40	160
	A/Novosibirsk/77/2013	40	40	160
	A/Novosibirsk/79/2013	40	40	640

Штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. уже не проявляли кросс-реактивности с сывороткой к штамму A/Perth/16/2009 и характеризовались снижением титра ингибирования сывороткой к актуальному вакцинному штамму A/Victoria/361/2011. Вероятно, антигенный дрейф от штамма A/Victoria/361/2011 связан с аминокислотными заменами R142G и N145S в антигенном сайте А. Примечательно, что штамм A/Novosibirsk/79/2013, в НА которого отсутствует мутация N145S, в большей мере, чем остальные штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг., схож с актуальным вакцинным штаммом: соотношение титра ингибирования

сывороткой A/Victoria/361/2011 к гомологичному титру составило 1:2, против 1:4 – 1:8 для других штаммов сезона.

### **Изменчивость первичной структуры белка NA**

С 2008 по 2013 гг. аминокислотные замены в NA происходили по 19 позициям. Из анализа исключены позиции, в которых обнаружены одиночные штаммспецифичные замены, т.е. рассматриваются положения, замены в которых обнаружены в двух и более штаммах, изолированных в азиатской части РФ (табл. 20). Также, в контексте изменчивости исследованных штаммов, не рассматривается замены в положениях 258 и 329, т.к. они характерны для всех штаммов. Но эти замены отличают рассматриваемые штаммы от вакцинного штамма A/Victoria/361/2011, что обусловило их включение в таблицу.

Рассматривая динамику появления характерных (встречающихся в нескольких штаммах) для отдельных эпидемических сезонов аминокислотных замен в NA, можно отметить, что в пределах конкретных сезонов, кроме эпидемического сезона 2008-2009 гг. паттерны распределения замен характеризуются низкой вариабельностью. Штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2008-2009 по первичной структуре NA более выражено отличаются между собой, чем штаммы других сезонов. Аминокислотные замены в позициях 151, 221, 339, 463 и 464 не только обуславливают отличие штаммов сезона 2008-2009 от штаммов, изолированных в другие сезоны, но и дифференцируют штаммы в пределах эпидемического сезона.

Из 19 позиций аминокислотных замен всего в двух обнаружено более двух вариантов аминокислоты: D-G-A в положении 151 и I-M-V в положении 469. Позиции пяти аминокислотных замен относятся к антигенным сайтам NA, а именно к трем (4, 5, 6) из 7 районов связывания антител.

Замена I464L, обнаруженная в штамме эпидемического сезона 2008-2009 гг. и классифицированная как спорадическая, в эпидемических сезонах 2011-2012 гг. и 2012-2013 была выявлена во всех исследованных штаммах. Аминокислота D93 сохранялась в вирусной популяции на протяжении двух эпидемических сезонов и затем была элиминирована в результате замены D93G, но обнаружилась в штамме эпидемического сезона 2011-2012 гг. A/Novosibirsk/02d/2012. Аминокислотная замена E221D была обнаружена всего в трех штаммах эпидемического сезона 2008-2009 гг. и, в дальнейшем, выявлена только как спорадическая замена в NA штамма A/Krasnoyarsk/919/2013 (эпидемический сезон 2012-2013 гг.).



По паттерну аминокислотных замен из всего пула изученных последовательностей выделяются NA штаммов, изолированных в эпидемический сезон 2010-2011 гг. Именно в этих последовательностях обнаружено наибольшее количество замен (D127N, I307M, L338F, N342D и R430S), не встречающихся в других эпидемических сезонах. Из 6 аминокислотных замен, впервые (с 2008 г.) обнаруженных именно в штаммах эпидемического сезона 2010-2011, всего 1 замена N402D встречалась в последующих сезонах.

На пространственной модели (рис. 18) отображены аминокислотные замены, выявленные в NA хотя бы двух штаммов из рассматриваемых. Пять замен принадлежат к антигенным сайтам NA: D339N, N342D в антигенном сайте 4, S367N и K369T в антигенном сайте 5, N402D в антигенном сайте 6. Эти замены ожидаемо локализованы на поверхности NA. Кроме того, 6 аминокислотных замен, не входящих в антигенные сайты, также расположены на поверхности NA рядом с активным центром и антигенными сайтами. Остальные позиции аминокислотных замен отдалены от активной зоны NA и локализованы на нижней и боковых поверхностях или же в глубине структуры.

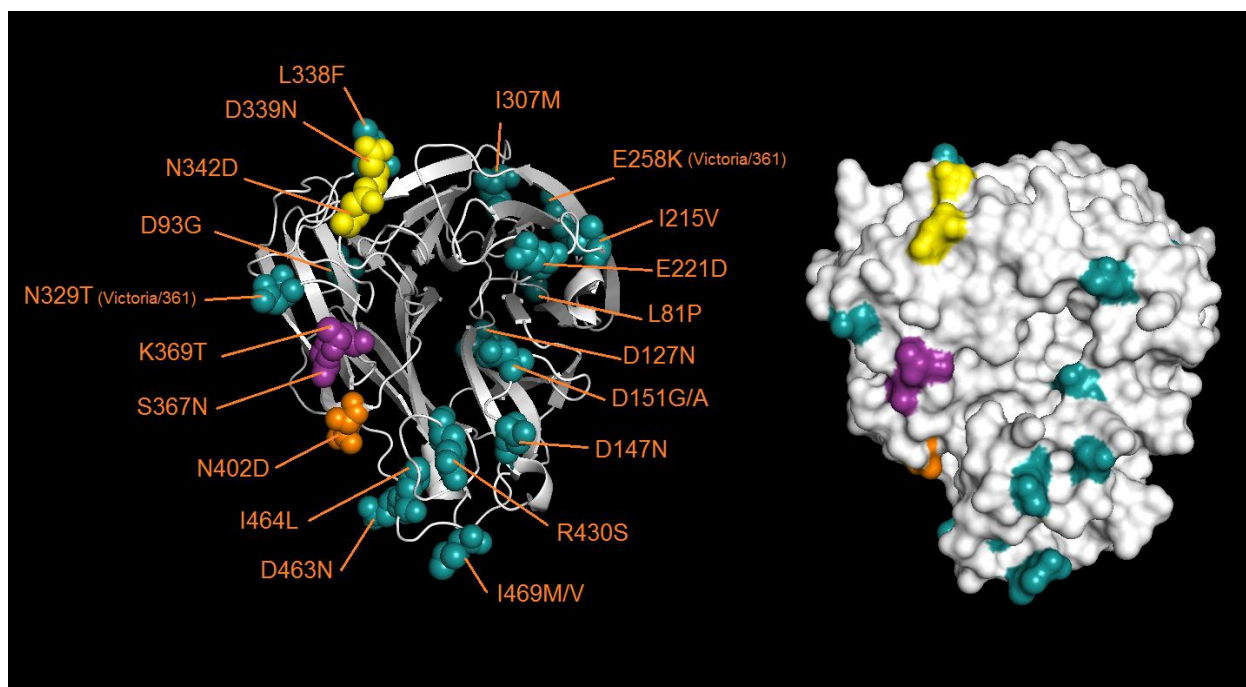


Рисунок 18. Аминокислотные замены в NA штаммов вируса гриппа A(H3N2) изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. Название вакцинного штамма в скобках указывает на аминокислотную замену, встречающуюся только в этом штамме и не обнаруженную в NA других штаммов. Различные цвета указывают на принадлежность мутаций к отдельным антигенным сайтам: желтый – 4, фиолетовый – 5, оранжевый – 6, голубой – позиция аминокислотной замены не относится к антигенным сайтам.

Одной из задач систематического мониторинга вирусов гриппа, циркулировавших в человеческой популяции, является оценка чувствительности вирусов к действию этиотропных

химиопрепаратов, используемых для лечения гриппа. У штаммов вируса гриппа А(Н3N2) к снижению чувствительности к ингибиторам нейраминазы (озельтамивир, занамивир и перамивир) приводят мутации E119V, E119V+I222V, del244-247, Q136K, R292K, N294S, (Nguyen, 2012; Samson, 2013). При анализе аминокислотных последовательностей NA исследованных штаммов были выявлены замены D151G и D151A, которые по литературным данным могут приводить к снижению чувствительности вируса к действию занамивира (Mohr, 2015; Zaraket, 2016; Mishin, 2014).

Примечательно, что снижение ингибирующей активности занамивира по отношению к NA с заменами D151G и D151A было показано только методом хемилюминисценции (с использованием субстрата NA-star), но не методом флуоресценции (субстрат MUNANA).

Для исследованных штаммов экспериментально (с использованием флуоресцентно-меченного субстрата MUNANA) было показано, что под воздействием ингибиторов нейраминидазы (озельтамивир и занамивир) происходит снижение ее активности по сравнению с контрольным мутантным штаммом, обладающим сниженной чувствительностью к действию препаратов. Но, к сожалению, метод флуоресцентного анализа ингибирования активности нейраминидазы, основанный на использовании субстрата MUNANA, не позволяет оценить влияние замен D151G и D151A (Mishin, 2014).

Можно отметить различия в распределении аминокислотных замен между штаммами, изолированными в разные эпидемические сезоны. В частности, 4 эпидемических сезона, по паттернам аминокислотных замен можно разделить на 3 группы:

- 1) Эпидемический сезон 2008-2009 гг.
- 2) Эпидемический сезон 2010-2011 гг.
- 3) Эпидемические сезоны 2011-2012 и 2012-2013 гг.

Для штаммов, изолированных в эпидемические сезоны 2011-2012 и 2012-2013 гг., не выявлено изменений в паттерне аминокислотных замен: штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. характеризуются отсутствием новых, характерных хотя бы для нескольких штаммов, аминокислотных замен относительно предыдущего сезона, что коррелирует с отсутствием изменения в составе вакцины.

#### **Филогенетический анализ и анализ эволюционных дистанций между последовательностями NA**

По структуре филогенетической дендрограммы (рис. 19) видно, что все последовательности на аминокислотном уровне подразделяются на несколько групп:

- 1) Штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2008-2009 гг., за исключением A/Novosibirsk/31/2009
- 2) Штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2010-2011 гг.



- 3) Штамм A/Novosibirsk/31/2009
- 4) Штаммы, изолированные в эпидемические сезоны 2011-2012 и 2012-2013 гг.

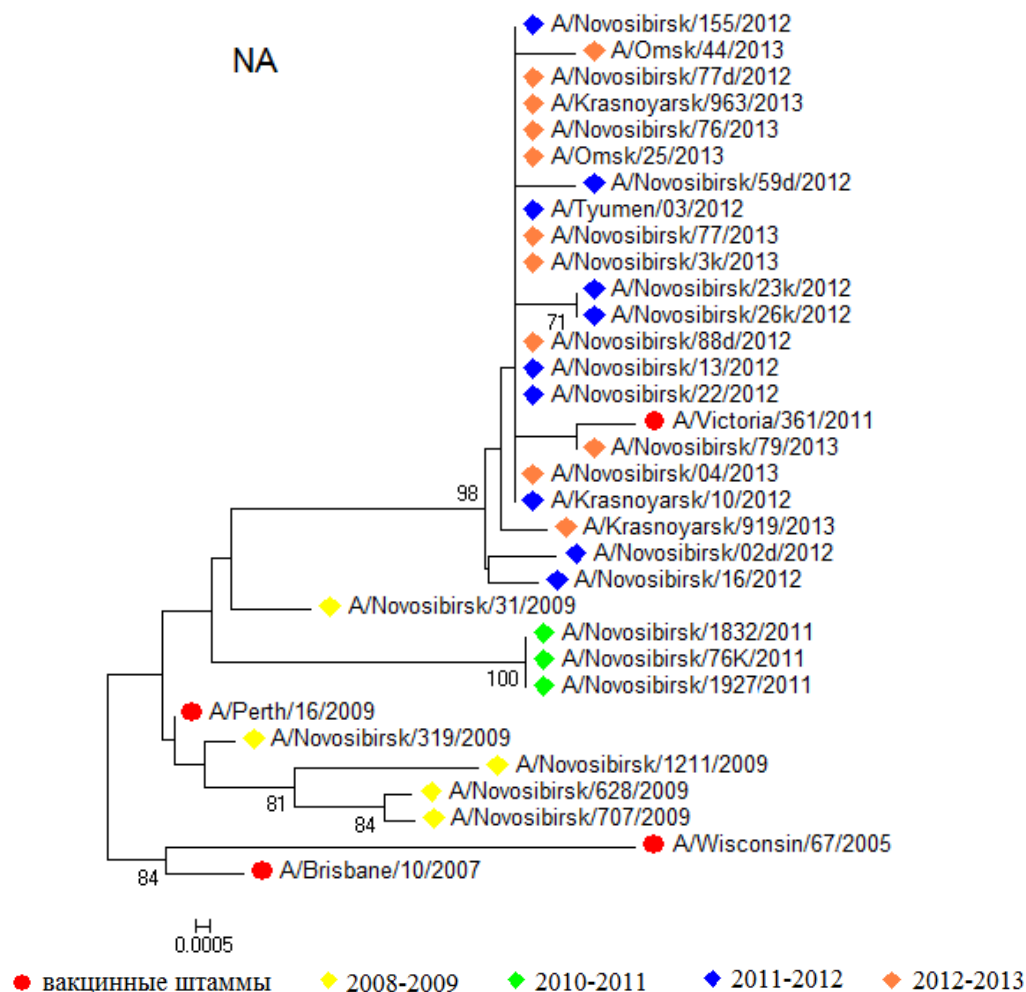


Рисунок 19. Дендрограмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. и вакцинных штаммов соответствующих эпидемических сезонов.

Примечательно, что несмотря на наличие ключевых аминокислотных замен, согласно которым исследованные штаммы эпидемического сезона 2008-2009 относятся к кладе A/Brisbane/10, исходя из филогенетической дендрограммы, по аминокислотной последовательности NA эти изоляты близки к штамму A/Perth/16/2009. А штамм A/Novosibirsk/31/2009 филогенетически удален как от вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007, так и от штамма A/Perth/16/2009.

Штаммы, выделенные в эпидемический сезон 2010-2011 гг., образуют отдельную гомогенную филогенетическую группу, дистанцированную от актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009.

Аминокислотные последовательности NA штаммов, изолированных в эпидемические сезоны 2011-2012 и 2012-2013 гг., родственны NA вакцинного штамма A/Victoria/361/2011 и в

целом характеризуются низкой степенью гетерогенности (за исключением двух штаммов из 22).

Филогенетическая удаленность от вакцинных штаммов, но при этом близость штаммов в пределах отдельных эпидемических сезонов, указывают на антигенный дрейф вирусной популяции – т.е. на накопление одинаковых аминокислотных замен, обуславливающих уход вирусов от иммунного ответа со стороны организма-хозяина.

Последовательное (в пределах одной генетической клады) изменение паттерна аминокислотных замен характерно только между сезонами 2011-2012 и 2012-2013 гг., что коррелирует с сохранением штамма A/Victoria/361/2011 в составе вакцины. В остальных случаях: между эпидемическими сезонами 2008-2009 и 2010-2011 гг, а также 2011-2012 гг. происходили более значительные изменения в первичной структуре белка NA циркулировавших штаммов.

Обнаруженный характер филогенетических связей (удаленность исследованных штаммов разных эпидемических сезонов, смена циркулировавших пулов вирусов, выраженный антигенный дрейф в пределах отдельных генетических групп) указывает на то, что сезонная циркуляция вируса гриппа А(Н3N2) на территории азиатской части РФ обуславливается множественными заносами вирусов извне.

#### **Эволюционные дистанции между NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2)**

Для комплексной оценки изменчивости штаммов различных сезонов относительно друг друга, а также относительно вакцинных штаммов, были построены матрицы попарных дистанций (на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей). Результаты представлены в виде «тепловых карт» (рис. 20). Как для нуклеотидных, так и для аминокислотных последовательностей (в большей степени) показано постепенное увеличение дистанций относительно вакцинных штаммов. Т.е. происходило кумулятивное накопление мутаций.

При анализе дистанций между последовательностями NA штаммов разных эпидемических сезонов обнаружено, что штаммы предпандемического сезона 2008-2009 гг. значительно отличаются от штаммов трех последующих сезонов, а штаммы, изолированные в 2010-2011 гг., соответственно, от двух следующих сезонов. Наибольшая гетерогенность по структуре NA характерна для штаммов предпандемического сезона 2008-2009 гг. Кроме того, аминокислотные последовательности NA штаммов эпидемического сезона 2008-2009 гг. дифференцируются между собой по эволюционному расстоянию от более поздних изолятов вируса гриппа: A/Novosibirsk/628/2009, A/Novosibirsk/707/2009 и A/Novosibirsk/1211/2009 дистанцированы от штаммов сезонов 2010-2011, 2011-2012 и 2012-2013 г. в большей степени, чем A/Novosibirsk/31/2009 и A/Novosibirsk/319/2009.

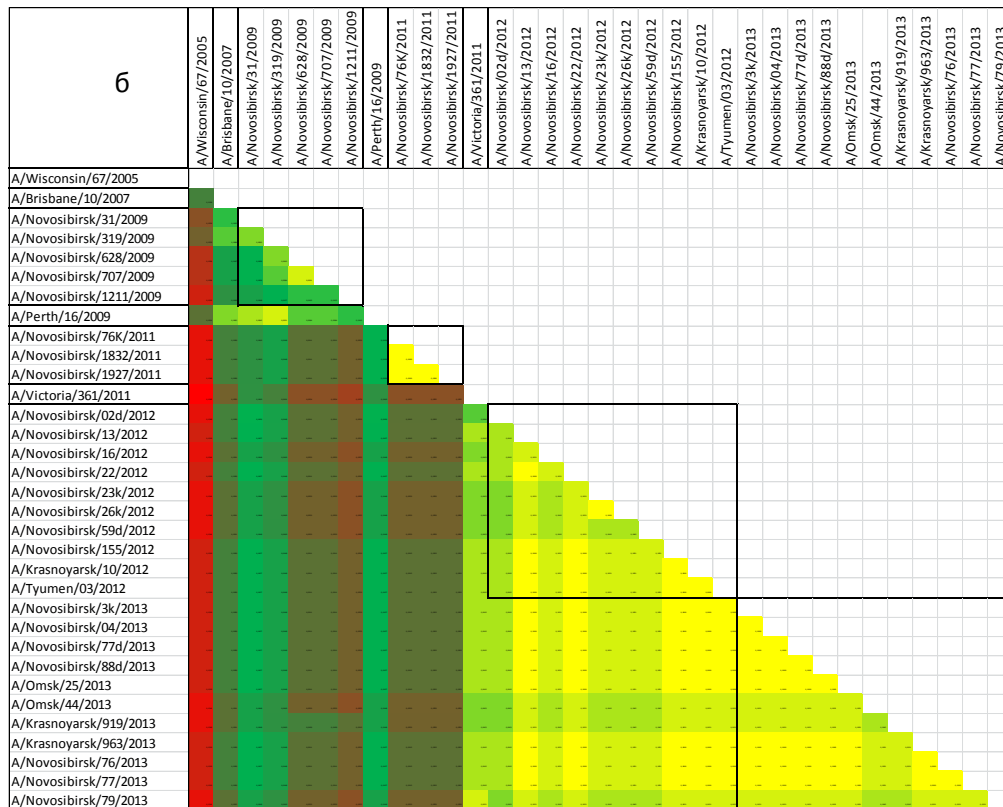
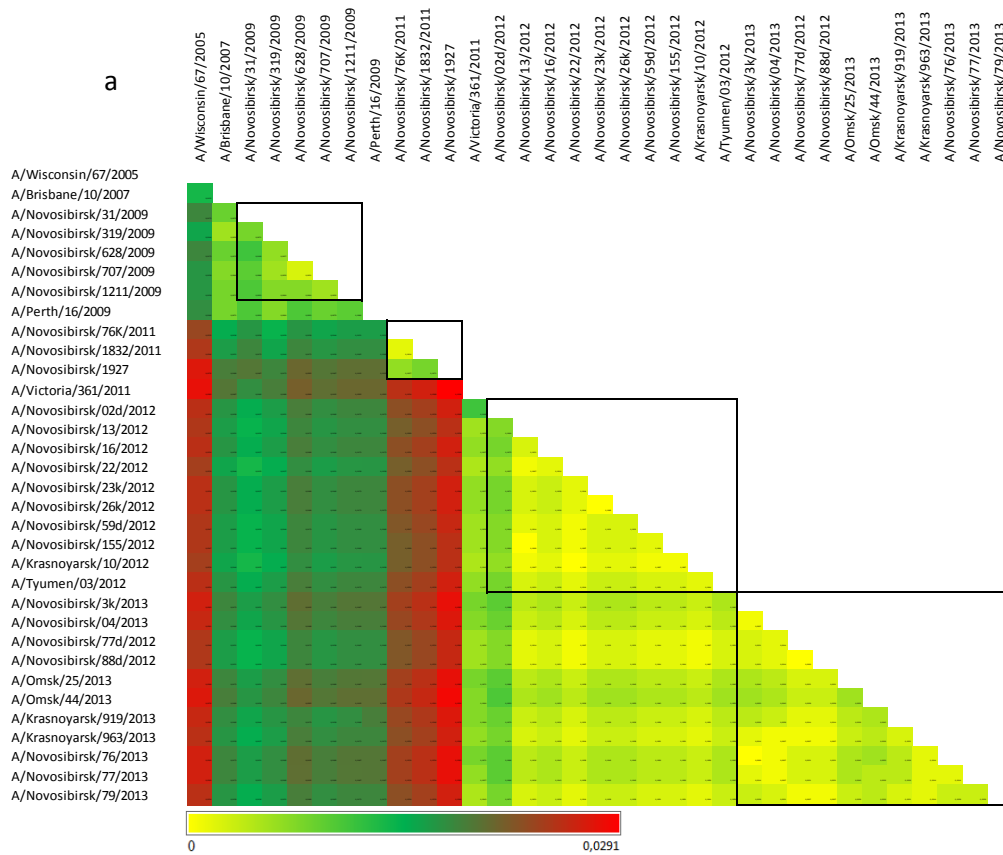


Рисунок 20. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями НА штаммов вируса гриппа А(Н3N2).

Последовательности NA изолятов вируса гриппа А(Н3N2), выделенные из проб, собранных в течение эпидемических сезонов 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг., незначительно дистанцированы как в пределах сезонов, так и между ними.

Средние значения дистанций между NA штаммов, изолированных в 2008-2009 гг. и штаммов, изолированных в 2010-2011 гг. равны  $0,167 \pm 0,0020$  на нуклеотидном уровне и  $0,0194 \pm 0,0031$  на аминокислотном. Попарные дистанции между штаммами эпидемических сезонов 2008-2009 гг. и 2011-2012 гг. в среднем равны  $0,0156 \pm 0,0017$  для нуклеотидных последовательностей NA и  $0,0195 \pm 0,0043$  – для аминокислотных. Т.е. по структуре NA штаммы двух постпандемических сезонов эволюционно равноудалены от штаммов предпандемического сезона. При этом последовательности NA штаммов сезона 2011-2012 гг. значительно дистанцированы от NA штаммов предыдущего сезона 2010-2011 гг..

#### **Филогенетический анализ первичной структуры сегмента генома, кодирующего NA**

Согласно филогенетической сети (рис. 21), NA штаммов выделенных в эпидемические сезоны 2010-2011 гг, 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг. образуют компактные группы схожих последовательностей (исключение составляет штамм A/Novosibirsk/02d/2012). Пул NA штаммов сезона 2008-2009 гг. характеризуется наибольшей гетерогенностью. Кроме того, штамм A/Novosibirsk/31/2009 по нуклеотидной последовательности NA дистанцирован от других штаммов эпидемического сезона.

Можно отметить, что штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. наиболее дистанцированы от остальных исследованных изолятов, как предпандемических, так и постпандемических сезонов. Более того, они генетически отличны от вакцинного штамма A/Perth/16/2009.

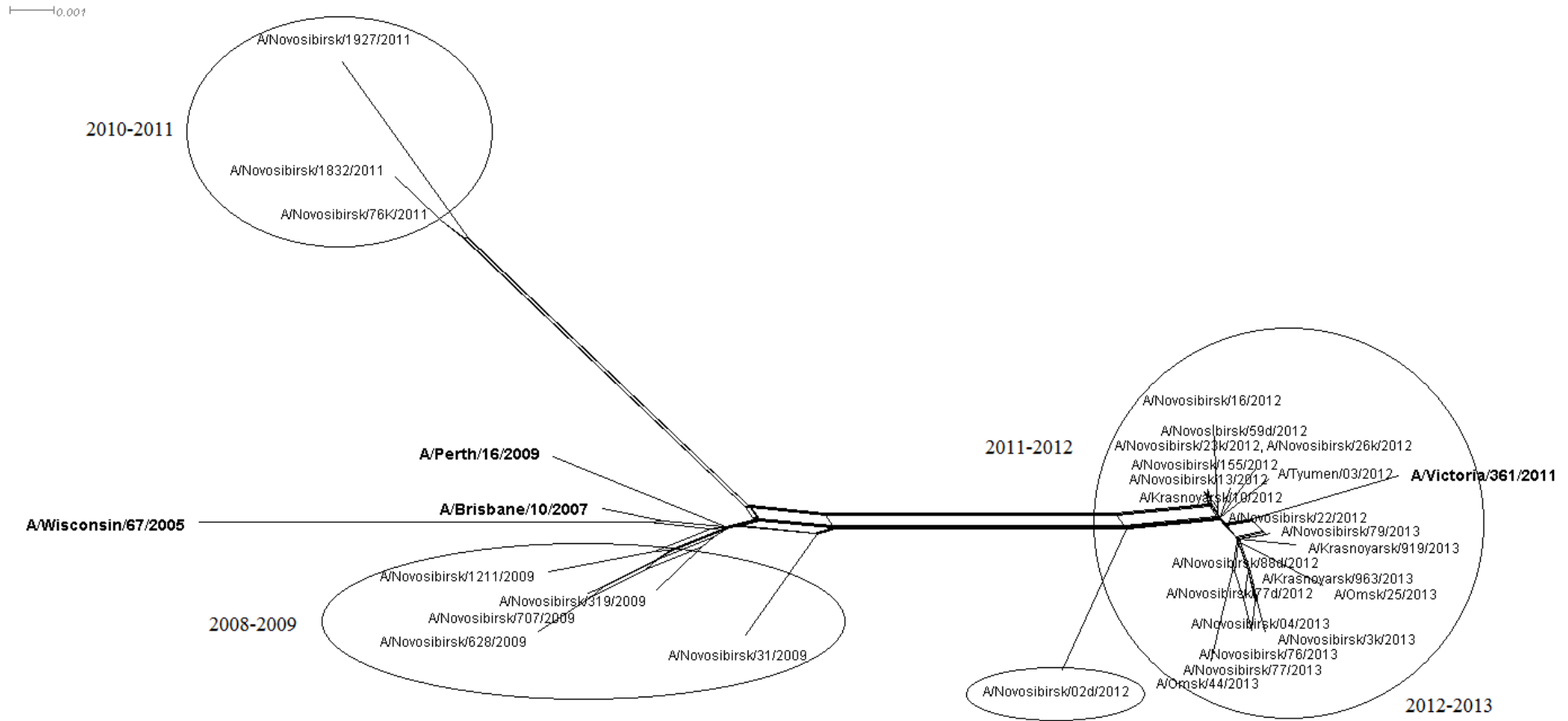


Рисунок 21 - Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа А Н3N2, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2012 гг., а также вакцинных штаммов.

Штаммы эпидемического сезона 2008-2009 по первичной структуре гена, кодирующего NA, разнесены по трем ветвям филогенетического дерева (рис. 22). Такой характер филогенетических связей позволяет предположить, что в сезон 2008-2009 гг. имели место множественные заносы штаммов вируса гриппа на территорию азиатской части РФ. Кроме того, филогенетическая удаленность исследованных штаммов от актуального на тот момент вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007 указывает на то, что рассматриваемые штаммы являются дрейфовыми вариантами относительно штамма, входящего в состав вакцины. Исходя из того, что по паттерну аминокислотных замен в NA штаммы сезона 2008-2009 схожи не только между собой, но и с вакцинным штаммом A/Brisbane/10/2007, можно заключить, что филогенетическая удаленность, главным образом, обуславливается синонимичными заменами в соответствующем сегменте генома вируса. Т.е. несмотря на наличие ключевых аминокислотных замен, характерных для клады A/Brisbane/10, генетически исследованные изоляты значительно отличаются от актуального вакцинного штамма.

Штаммы эпидемического сезона 2010-2011, выделенные на территории азиатской части РФ, по первичной структуре гена NA отдалены от вакцинного штамма A/Perth/16 и локализованы на другой ветви филогенетического дерева. Согласно филогенетическому анализу, в пределах эпидемического сезона 2010-2011 исследованные штаммы близкородственны между собой и схожи со штаммами, выделенными на территории Японии, Китая и Швеции, что подтверждается BLAST-анализом. Из этого можно заключить, что, вероятно, во время пандемии вируса гриппа A(H1N1) pdm09 получил распространение пул штаммов вируса гриппа A(H3N2), генетически значительно отличающийся от рекомендованного ВОЗ вакцинного штамма.

Штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2011-2012 гг., относятся к генетической кладе A/Victoria/208. При этом рассматриваемые последовательности локализованы на разных ветвях филогенетического дерева. Штамм A/Novosibirsk/02d/2012 наиболее отдален от остальных штаммов сезона и относится к другой генетической группе клады A/Victoria/208. Остальные исследованные штаммы образуют отдельные группы (хотя и генетически незначительно удаленные одна от другой), в которые, в том числе, входят как другие российские изоляты вируса гриппа A(H3N2), так и штаммы, выделенные на территории других стран. Таким образом, выявленные филогенетические различия между исследованными изолятами указывают на то, что в эпидемический сезон 2011-2012 гг. вирус гриппа не эволюционировал в межсезонье на территории азиатской части РФ, а был занесен извне. Кроме того, рассматриваемые последовательности относятся к ветвям филогенетического дерева, отдельным от штамма A/Victoria/361/2011, что свидетельствует о генетическом дрейфе относительно вакцинного штамма.

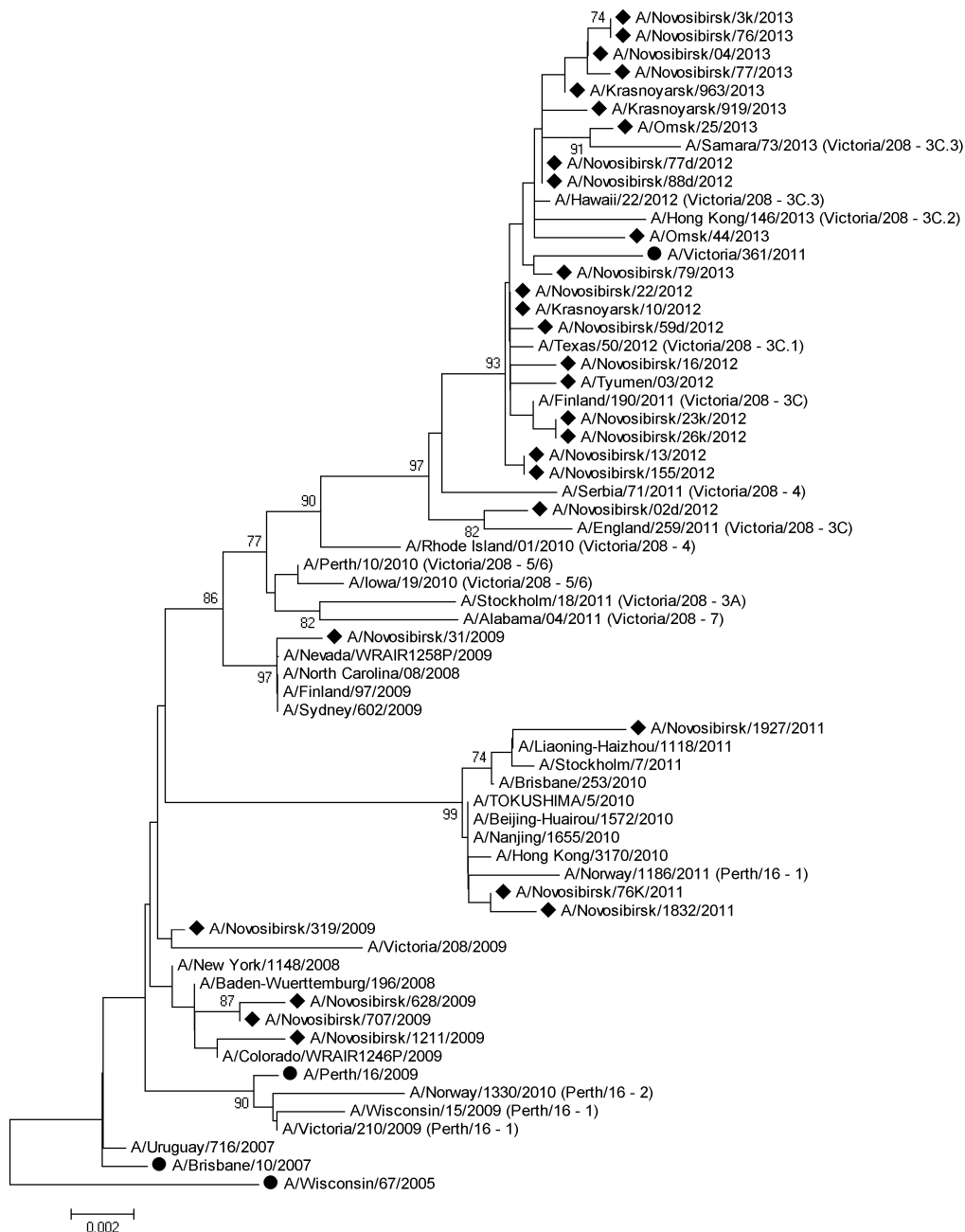


Рисунок 22. Филогенетическая дендрограма, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа А(Н3N2). Круглые маркеры – вакцинные штаммы. Ромбовидные маркеры – исследуемые штаммы.

Штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2012-2013 гг. относятся к генетической кладе A/Victoria/208, и характеризуются незначительными генетическими отличиями не только между собой, но и от актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011. Рассматриваемые последовательности представляют собой результат продолжающегося генетического дрейфа относительно штаммов предыдущего эпидемического сезона. Исходя из характера филогенетических связей (образование локальных филогенетических групп, генетическая отдаленность нескольких штаммов) рассматриваемых последовательностей NA эпидемического

сезона 2012-2013 гг. можно, также как и в предыдущие сезоны, предположить множественные заносы вируса гриппа в азиатскую часть РФ.

### 3.2 Анализ изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа В

Таблица 21. Штаммы вируса гриппа В, для которых были определены первичные структуры генов НА и NA.

Название штамма	Сезон	Генетическая линия НА	Генетическая подгруппа НА	Генетическая линия NA	Генетическая подгруппа NA
B/Novosibirsk/24/2009	8/9	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/36/2009	8/9	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/42/2009	8/9	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/50/2009	8/9	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/715/2009	8/9	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/01/2010	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/04/2010	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/01/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/02/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/03/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/04/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/05/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/08/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/09/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/07k/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/12k/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/29k/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Novosibirsk/91k/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Tomsk/12/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Yekaterinburg/129/2011	10/11	Victoria	1B	Victoria	1B
B/Irkutsk/292/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Irkutsk/365/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Irkutsk/394/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Irkutsk/473/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Irkutsk/489/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Magadan/478/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Magadan/515/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/74/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/34/2012	11/12	Yamagata	3	Yamagata	3
B/Omsk/7/2012	11/12	Yamagata	3	Yamagata	3
B/Vladivostok/103/2012	11/12	Yamagata	3	Yamagata	3
B/Vladivostok/693/2012	11/12	Yamagata	3	Yamagata	3
B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012	11/12	Victoria	1A	Victoria	1A
B/Novosibirsk/03/2013	12/13	Yamagata	2	Yamagata	2
B/Novosibirsk/05/2013	12/13	Yamagata	2	Yamagata	2
B/Novosibirsk/LP/2013	12/13	Yamagata	2	Yamagata	2

Большинство исследованных изолятов вируса гриппа В принадлежали к генетической линии В/Victoria. Вирусы гриппа, относящиеся к генетической линии В/Yamagata, за



рассматриваемый период времени (2008-2013 гг.) впервые были обнаружены в эпидемический сезон 2011-2012 гг. Всего в рамках этой работы было исследовано 29 изолятов вируса гриппа В линии В/Victoria и 7 изолятов вируса линии В/Yamagata.

В период пандемии вируса гриппа А(Н1N1) pdm09 (эпидемический сезон 2009-2010 гг.) на территории азиатской части РФ нами не было обнаружено штаммов вируса гриппа В. Таким образом, в этом исследовании рассматриваются эпидемические сезоны 2008-2009 гг., 2010-2011 гг., 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг.

Были определены полные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих поверхностные гликопротеины (НА и NA) и по этим двум сегментам генома осуществлен сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов вируса гриппа В, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока РФ. Кроме последовательностей геномов, выделенных в рамках этой работы изолятов, в исследовании в качестве референс-последовательностей использовались первичные структуры НА и NA вакцинных штаммов: В/Malaysia/2506/2004 и В/Brisbane/60/2008 для генетической линии В/Victoria; В/Florida/4/2006 и В/Wisconsin/01/2010 для линии В/Yamagata.

### **3.2.1 Молекулярно-генетический анализ изменчивости НА сезонных (эпидемических) изолятов вируса гриппа В, выделенных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.**

#### **Эпидемический сезон 2008-2009**

В качестве референс-последовательностей в матрицу попарных дистанций (табл. 22) включены нуклеотидные и аминокислотные последовательности НА штаммов В/Malaysia/2506/2004 (предыдущий вакцинный штамм относительно эпидемического сезона 2008-2009 гг.) и В/Brisbane/60/2008 (актуальный в эпидемическом сезоне 2008-2009 гг. вакцинный штамм). Дистанция между НА вакцинных штаммов равна 0,0106 на нуклеотидном уровне и 0,0070 на аминокислотном. Т.е. именно эти величины можно ассоциировать с изменчивостью НА, связанной со сменой вакцинного штамма.

Последовательности НА штаммов вируса гриппа, выделенных в эпидемический сезон 2008-2009 гг., характеризуются высокой степенью взаимной идентичности как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровнях. Генетические дистанции между 4 из 5 НА сибирских штаммов равны 0,0000, т.е. сегменты генома, кодирующие НА, полностью идентичны на нуклеотидном уровне. Исключением являются эволюционные расстояния всех исследованных изолятов от штамма В/Novosibirsk/715/2009, составляющие 0,0006. На уровне аминокислотных последовательностей НА большинство (4 из 5) исследованных сибирских штаммов эпидемического сезона 2008-2009 также идентичны, а дистанция от штамма В/Novosibirsk/715/2009 равна 0,0017.

Таблица 22. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей HA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг.

	B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008	B/Novosibirsk/24/2009	B/Novosibirsk/36/2009	B/Novosibirsk/42/2009	B/Novosibirsk/50/2009	B/Novosibirsk/715/2009
Аминокислотные последовательности							
B/Malaysia/2506/2004		0,0070	0,0070	0,0070	0,0070	0,0070	0,0087
B/Brisbane/60/2008	0,0106		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017
B/Novosibirsk/24/2009	0,0112	0,0029		0,0000	0,0000	0,0000	0,0017
B/Novosibirsk/36/2009	0,0112	0,0029	0,0000		0,0000	0,0000	0,0017
B/Novosibirsk/42/2009	0,0112	0,0029	0,0000	0,0000		0,0000	0,0017
B/Novosibirsk/50/2009	0,0112	0,0029	0,0000	0,0000	0,0000		0,0017
B/Novosibirsk/715/2009	0,0118	0,0035	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	
Нуклеотидные последовательности							

Отличия нуклеотидной последовательности HA исследованных штаммов от HA вакцинного штамма B/Brisbane/60/2008 более выражены, чем между сибирскими штаммами: 0,0029 для штаммов B/Novosibirsk/24/2009, B/Novosibirsk/36/2009, B/Novosibirsk/42/2009 и B/Novosibirsk/50/2009 и 0,0035 для штамма B/Novosibirsk/715/2009 (среднее значение  $0,0030 \pm 0,0002$ ). При этом генетические дистанции между анализируемыми последовательностями и HA штамма B/Malaysia/2506/2004 более значительны: 0,0112 и 0,0118 ( $0,0113 \pm 0,0002$ ), т.е. превышают эволюционную дистанцию между актуальным и предыдущим вакцинными штаммами. Следовательно, все исследованные штаммы по первичной структуре гена HA близки к вакцинному штамму B/Brisbane/60/2008 и значительно отличаются от штамма B/Malaysia/2506/2004, ранее входившего в состав вакцины.

Примечательно, что согласно матрице дистанций, из пяти исследованных штаммов четыре характеризуются полной идентичностью первичной структуры гена HA. Кроме того, на аминокислотном уровне штаммы B/Novosibirsk/24/2009, B/Novosibirsk/36/2009, B/Novosibirsk/42/2009 и B/Novosibirsk/50/2009 полностью идентичны вакцинному штамму эпидемического сезона 2008-2009 - B/Brisbane/60/2008. Один штамм (B/Novosibirsk/715/2009) по последовательности HA незначительно (по сравнению с различиями между последовательностями HA вакцинных штаммов разных сезонов) отличается как от других штаммов эпидемического сезона, так и от вакцинного штамма B/Brisbane/60/2008.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине (табл. 23), все штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. содержат по 4 замены, общих со штаммом B/Brisbane/60/2008 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма B/Malaysia/2506/2004: N75K, V146I, N165K и S172P.

Таблица 23. Сравнительный анализ аминокислотных замен в HA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам HA. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с актуальным вакцинным штаммом A/Brisbane/60/2008.

Антигенный сайт	BE	BA	BB2		
Нумерация по В/Lee/40	75	146	164	171	198
Нумерация по В/Malaysia/2506/2004	75	146	165	172	199
B/Malaysia/2506/2004	N	V	N	S	T
B/Brisbane/60/2008	K	I	K	P	
B/Novosibirsk/24/2009	K	I	K	P	
B/Novosibirsk/36/2009	K	I	K	P	
B/Novosibirsk/42/2009	K	I	K	P	
B/Novosibirsk/50/2009	K	I	K	P	
B/Novosibirsk/715/2009	K	I	K	P	I

Штамм B/Novosibirsk/715/2009 по аминокислотной последовательности HA отличается от других штаммов эпидемического сезона всего одной заменой – T199I. При этом аминокислотные замены N75K, V146I и N165K расположены в антигенных сайтах (в таблице 23 приведена соответствующая нумерация относительно прототипного штамма B/Lee/40) BE, BA и BB2 соответственно и, следовательно, вероятно ассоциированы с изменением антигенных свойств вируса.

Аминокислотные замены N75K, N165K и S172P являются ключевыми заменами, обуславливающими принадлежность HA исследованных штаммов вируса гриппа В эпидемического сезона 2008-2009 гг. к генетической кладе 1 (B/Brisbane/60-подобные) линии B/Victoria (WHO, 2014), а замена V146I позволяет отнести последовательности HA к генетической подгруппе 1A этой клады.

Замена, обнаруженная в позиции 199 HA штамма B/Novosibirsk/715/2009, не относилась к антигенным сайтам. Эта замена примечательна тем, что приводила к элиминированию потенциального сайта гликозилирования NET<sub>197-199</sub>. При моделировании пространственной структуры HA с заменой N199I, была выявлена ее поверхностная локализация и, соответственно, эта мутация потенциально могла обуславливать изменение антигенных характеристик вируса.

### Эпидемический сезон 2010-2011

Согласно рекомендациям ВОЗ (WHO, 2010), в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. вакцинным штаммом вируса гриппа В генетической линии В/Victoria все еще был В/Brisbane/60/2008. Следовательно, как и в случае с эпидемическим сезоном 2008-2009 гг., в матрицу попарных эволюционных дистанций (табл. 24) в качестве рефернс-штаммов были включены В/Malaysia/2506/2004 (как предыдущий вакцинный штамм) и В/Brisbane/60/2008 (как актуальный вакцинный штамм). Дистанция между НА этих штаммов равна 0,0106 на нуклеотидном уровне и 0,0070 на аминокислотном. Именно эти величины можно ассоциировать с изменчивостью НА, связанной со сменой вакцинного штамма.

В пределах отдельного географического региона (Новосибирская область), некоторые штаммы характеризуется высокой степенью взаимной идентичности НА: полностью совпадают первичные структуры гена НА у нескольких групп штаммов, изолированных на территории Новосибирской области, а ряд штаммов, из-за наличия синонимичных замен, характеризуется идентичностью только аминокислотных последовательностей НА (выделены подчеркиванием):

1) В/Novosibirsk/01/2010, В/Novosibirsk/04/2010, В/Novosibirsk/09/2011, В/Novosibirsk/07k/2011, В/Novosibirsk/12k/2011;

2) В/Novosibirsk/01/2011, В/Novosibirsk/02/2011, В/Novosibirsk/03/2011, В/Novosibirsk/29k/2011, В/Novosibirsk/91k/2011;

3) В/Novosibirsk/04/2011, В/Novosibirsk/08/2011.

При полной идентичности последовательностей внутри групп, сами группы генетически отличаются одна от другой. Кроме того, из рассматриваемых последовательностей НА штаммов, изолированных в Новосибирской области, выделяется первичная структура НА штамма В/Novosibirsk/05/2011, которая характеризуется максимальным отличием от последовательностей НА остальных новосибирских штаммов (на нуклеотидном и аминокислотном уровнях).

Таблица 24. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг.

	B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008	B/Novosibirsk/01/2010	B/Novosibirsk/04/2010	B/Novosibirsk/01/2011	B/Novosibirsk/02/2011	B/Novosibirsk/03/2011	B/Novosibirsk/04/2011	B/Novosibirsk/05/2011	B/Novosibirsk/08/2011	B/Novosibirsk/09/2011	B/Novosibirsk/07k/2011	B/Novosibirsk/12k/2011	B/Novosibirsk/29k/2011	B/Novosibirsk/91k/2011	B/Tomsk/12/2011	B/Yekaterinburg/129/2011
	Аминокислотные последовательности																
B/Malaysia/2506/2004		0,0070	0,0070	0,0070	0,0087	0,0087	0,0087	0,0087	0,0105	0,0087	0,0070	0,0070	0,0070	0,0087	0,0087	0,0087	0,0087
B/Brisbane/60/2008	0,0106		0,0035	0,0035	0,0052	0,0052	0,0052	0,0052	0,0070	0,0052	0,0035	0,0035	0,0035	0,0052	0,0052	0,0052	0,0052
B/Novosibirsk/01/2010	0,0124	0,0100		0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0035	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017
B/Novosibirsk/04/2010	0,0124	0,0100	0,0000		0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0035	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017
B/Novosibirsk/01/2011	0,0130	0,0106	0,0018	0,0018		0,0000	0,0000	0,0035	0,0017	0,0035	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0035	0,0035
B/Novosibirsk/02/2011	0,0136	0,0112	0,0023	0,0023	0,0006		0,0000	0,0035	0,0017	0,0035	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0035	0,0035
B/Novosibirsk/03/2011	0,0130	0,0106	0,0018	0,0018	0,0006	0,0006		0,0035	0,0017	0,0035	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0035	0,0035
B/Novosibirsk/04/2011	0,0124	0,0100	0,0012	0,0012	0,0018	0,0023	0,0018		0,0052	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035
B/Novosibirsk/05/2011	0,0142	0,0118	0,0029	0,0029	0,0012	0,0006	0,0012	0,0029		0,0052	0,0035	0,0035	0,0035	0,0017	0,0017	0,0052	0,0052
B/Novosibirsk/08/2011	0,0124	0,0100	0,0012	0,0012	0,0018	0,0023	0,0018	0,0000	0,0029		0,0017	0,0017	0,0017	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035
B/Novosibirsk/09/2011	0,0124	0,0100	0,0012	0,0012	0,0006	0,0012	0,0006	0,0012	0,0018	0,0012		0,0000	0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017
B/Novosibirsk/07k/2011	0,0136	0,0112	0,0023	0,0023	0,0018	0,0018	0,0018	0,0023	0,0023	0,0023	0,0012		0,0000	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017
B/Novosibirsk/12k/2011	0,0124	0,0100	0,0012	0,0012	0,0006	0,0012	0,0006	0,0012	0,0018	0,0012	0,0000	0,0012		0,0017	0,0017	0,0017	0,0017
B/Novosibirsk/29k/2011	0,0130	0,0106	0,0018	0,0018	0,0006	0,0006	0,0000	0,0018	0,0012	0,0018	0,0006	0,0018	0,0006		0,0000	0,0035	0,0035
B/Novosibirsk/91k/2011	0,0130	0,0106	0,0018	0,0018	0,0006	0,0006	0,0000	0,0018	0,0012	0,0018	0,0006	0,0018	0,0006	0,0000		0,0035	0,0035
B/Tomsk/12/2011	0,0124	0,0100	0,0047	0,0047	0,0053	0,0059	0,0053	0,0047	0,0065	0,0047	0,0047	0,0059	0,0047	0,0053	0,0053		0,0035
B/Yekaterinburg/129/2011	0,0130	0,0106	0,0076	0,0076	0,0082	0,0088	0,0082	0,0076	0,0094	0,0076	0,0076	0,0088	0,0076	0,0082	0,0082	0,0076	
	Нуклеотидные последовательности																

В целом последовательности (нуклеотидные и аминокислотные) HA штаммов вируса гриппа В, выделенных в эпидемический сезон 2010-2011 гг., характеризуются большей вариабельностью по сравнению со штаммами эпидемического сезона 2008-2009. Генетические дистанции составляют от 0,0000 до 0,0094 (среднее значение  $0,0027 \pm 0,0026$ ) и дистанции между аминокислотными последовательностями составляют от 0,0000 до 0,0052 ( $0,0020 \pm 0,0014$ ). Величина отклонения, главным образом, формируется за счет идентичных последовательностей и за счет штаммов В/Tomsk/12/2011 и В/Yekaterinburg/129/2011, дистанцированных от штаммов, изолированных на территории Новосибирской области. Так, при исключении из анализа идентичных последовательностей и последовательностей HA штаммов В/Tomsk/12/2011 и В/Yekaterinburg/129/2011, средние значения эволюционных дистанций между новосибирскими изолятами составляют  $0,0015 \pm 0,0006$  на нуклеотидном уровне и  $0,0023 \pm 0,0009$  на аминокислотном, что превышает соответствующие показатели для эпидемического сезона 2008-2009 гг. Последовательности HA штаммов В/Tomsk/12/2011 и В/Yekaterinburg/129/2011 значительно (относительно изолятов, выделенных в Новосибирской области) дистанцированы от остальных штаммов эпидемического сезона, как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровнях. Попарные дистанции между HA штаммов, изолированных в Томске и Екатеринбурге и новосибирских штаммов составляют на нуклеотидном уровне  $0,0054 \pm 0,0006$  для штамма В/Tomsk/12/2011 и  $0,0081 \pm 0,0006$  для штамма В/Yekaterinburg/129/2011, а на аминокислотном  $0,0030 \pm 0,0010$  для обоих штаммов.

В сезоне 2010-2011 выявлено увеличение (относительно эпидемического сезона 2008-2009 гг.) дистанций между HA исследованных штаммов и вакцинных штаммов В/Malaysia/2506/2004 и В/Brisbane/60/2008: попарные дистанции от предыдущего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004 составляют  $0,0129 \pm 0,0005$  на нуклеотидном уровне и  $0,0082 \pm 0,0010$  – на аминокислотном, а дистанции от актуального вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 –  $0,0105 \pm 0,0005$  и  $0,0048 \pm 0,0010$ . Это указывает на накопление как нуклеотидных, так и аминокислотных замен относительно референс-штаммов.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине (табл. 25), все штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. содержат по 3 замены, общих со штаммом В/Brisbane/60/2008 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004: N75K, N165K и S172P. В отдельных штаммах, обнаружены спорадические аминокислотные замены I117V, N166S и L413I относительно штаммов В/Malaysia/2506/2004 и В/Brisbane/60/2008.

Таблица 25. Сравнительный анализ аминокислотных замен в НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам НА. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с актуальным вакцинным штаммом А/Brisbane/60/2008, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

Антигенный сайт	BE	BE		BA	BB2	BB2				
<b>Нумерация по В/Lee/40</b>	58	75	117	146	164	165	171	266	412	558
<b>Нумерация по В/Malaysia/2506/2004</b>	58	75	117	146	165	166	172	267	413	559
В/Malaysia/2506/2004	L	N	I	V	N	N	S	I	L	V
В/Brisbane/60/2008		K		I	K		P			
В/Novosibirsk/01/2010	P	K			K		P			
В/Novosibirsk/04/2010	P	K			K		P			
В/Novosibirsk/01/2011	P	K			K		P			I
В/Novosibirsk/02/2011	P	K			K		P			I
В/Novosibirsk/03/2011	P	K			K		P			I
В/Novosibirsk/04/2011	P	K			K		P	V		
В/Novosibirsk/05/2011	P	K			K		P		I	I
В/Novosibirsk/08/2011	P	K			K		P	V		
В/Novosibirsk/09/2011	P	K			K		P			
В/Novosibirsk/07k/2011	P	K			K		P			
В/Novosibirsk/12k/2011	P	K			K		P			
В/Novosibirsk/29k/2011	P	K			K		P			I
В/Novosibirsk/91k/2011	P	K			K		P			I
В/Tomsk/12/2011	P	K			K	S	P			
В/Yekaterinburg/129/2011	P	K	V		K		P			

Также обнаружены аминокислотные замены, встречающиеся в двух и более штаммах (этими заменами и обуславливается вышеупомянутое выделение нескольких групп идентичных последовательностей НА):

- 1) I267V в штаммах В/Novosibirsk/04/2011, В/Novosibirsk/08/2011;
- 2) V559I (в субъединице НА2) в штаммах В/Novosibirsk/01/2011, В/Novosibirsk/02/2011, В/Novosibirsk/03/2011, В/Novosibirsk/29k/2011, В/Novosibirsk/91k/2011.

Кроме того, обнаружена замена L58P (в антигенном сайте BE), отличающая исследованные штаммы не только от штамма В/Malaysia/2506/2004, но и от действующего вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 и, вероятно, ассоциированная с изменением антигенных свойств. Аминокислотная замена L58P в совокупности с ключевыми заменами N75K, N165K и S172P позволяет отнести все исследованные последовательности НА к подгруппе 1В генетической клады 1 (В/Brisbane/60-подобные вирусы) линии В/Victoria.

Обнаруженная в позиции 166 (антигенный сайт BB2) HA штамма В/Tomsk/12/2011 аминокислотная замена приводит к исчезновению потенциального сайта гликозилирования NKT<sub>166-168</sub> и может быть связана с изменением антигенных характеристик вируса.

#### **Эпидемический сезон 2011-2012**

В течение эпидемического сезона 2011-2012 гг. в рамках этой работы была впервые выявлена ко-циркуляция двух генетических линий вируса гриппа типа В: В/Victoria и В/Yamagata.

#### *Изменчивость HA штаммов генетической линии В/Victoria*

По рекомендации ВОЗ, на эпидемический сезон 2011-2012 в составе вакцины был оставлен штамм В/Brisbane/60/2008. Следовательно, как и для двух ранее рассмотренных эпидемических сезонов, в матрице попарных эволюционных дистанций (табл. 26) в качестве референс-штаммов были оставлены В/Malaysia/2506/2004 (как предыдущий вакцинный штамм) и В/Brisbane/60/2008 (как актуальный вакцинный штамм). Дистанция между HA этих штаммов равна 0,0106 на нуклеотидном уровне и 0,0070 на аминокислотном.

Пул последовательностей (нуклеотидных и аминокислотных) HA штаммов вируса гриппа, выделенных в эпидемический сезон 2011-2012 гг., характеризуется гетерогенностью. Эволюционные дистанции в среднем составляют  $0,0029 \pm 0,0013$  для нуклеотидных последовательностей и  $0,0026 \pm 0,0010$  – для аминокислотных. Но попарные дистанции между HA нескольких штаммов равны 0,0000, т.е. последовательности идентичны. Из пяти штаммов, выделенных в Иркутске, два - В/Irkutsk/473/2012 и В/Irkutsk/489/2012 полностью идентичны на нуклеотидном и аминокислотном уровнях. А HA штаммов, выделенных в Магадане - В/Magadan/478/2012 и В/Magadan/515/2012 – характеризуются одинаковыми аминокислотными последовательностями.



Таблица 26. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.

	B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008	B/Irkutsk/292/2012	B/Irkutsk/365/2012	B/Irkutsk/394/2012	B/Irkutsk/473/2012	B/Irkutsk/489/2012	B/Magadan/478/2012	B/Magadan/515/2012	B/Novosibirsk/74/2012	B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012
	Аминокислотные последовательности										
B/Malaysia/2506/2004		0,0070	0,0070	0,0070	0,0070	0,0070	0,0070	0,0052	0,0052	0,0070	0,0070
B/Brisbane/60/2008	0,0106		0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0017	0,0017	0,0035	0,0035
B/Irkutsk/292/2012	0,0118	0,0059		0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0017	0,0017	0,0035	0,0035
B/Irkutsk/365/2012	0,0118	0,0059	0,0012		0,0035	0,0035	0,0035	0,0017	0,0017	0,0035	0,0035
B/Irkutsk/394/2012	0,0124	0,0065	0,0018	0,0018		0,0035	0,0035	0,0017	0,0017	0,0035	0,0035
B/Irkutsk/473/2012	0,0124	0,0065	0,0018	0,0018	0,0012		0,0000	0,0017	0,0017	0,0035	0,0035
B/Irkutsk/489/2012	0,0124	0,0065	0,0018	0,0018	0,0012	0,0000		0,0017	0,0017	0,0035	0,0035
B/Magadan/478/2012	0,0142	0,0082	0,0035	0,0035	0,0041	0,0041	0,0041		0,0000	0,0017	0,0017
B/Magadan/515/2012	0,0136	0,0076	0,0029	0,0029	0,0035	0,0035	0,0035	0,0006		0,0017	0,0017
B/Novosibirsk/74/2012	0,0130	0,0071	0,0023	0,0023	0,0029	0,0029	0,0029	0,0035	0,0029		0,0035
B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012	0,0142	0,0082	0,0035	0,0035	0,0041	0,0041	0,0041	0,0059	0,0053	0,0047	
	Нуклеотидные последовательности										

Выявлено изменение дистанций между НА исследованных штаммов и вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008: значения снизились относительно предыдущего эпидемического сезона и составляют  $0,0069 \pm 0,0009$  для нуклеотидных последовательностей и  $0,0031 \pm 0,0007$  – для аминокислотных. Парные генетические дистанции между НА изолятов эпидемического сезона 2011-2012 и НА штамма В/Malaysia/2506/2004 остались на уровне предыдущего эпидемического сезона и составили в среднем  $0,0128 \pm 0,0009$ , в то время как на аминокислотном уровне произошло уменьшение дистанций:  $0,0066 \pm 0,0007$ . Таким образом, по структуре НА к вакцинному штамму В/Brisbane/60/2008 штаммы вируса гриппа, изолированные в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., ближе, чем штаммы более раннего (постпандемического) эпидемического сезона 2010-2011 гг.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине (табл. 27), все штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. содержат по 3 замены, общих со штаммом В/Brisbane/60/2008 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004: N75K, N165K и S172P.

Таблица 27. Сравнительный анализ аминокислотных замен в НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам НА. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с актуальным вакцинным штаммом В/Brisbane/60/2008, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

Антигенный сайт				BE	BE	BA	BB2			
<b>Нумерация по В/Lee/40</b>	7	9	21	56	75	146	164	171	426	527
<b>Нумерация по В/Malaysia/2506/2004</b>	7	9	21	56	75	146	165	172	427	528
В/Malaysia/2506/2004	I	S	Q	K	N	V	N	S	L	G
В/Brisbane/60/2008					K	I	K	P		
В/Irkutsk/292/2012					K		K	P	I	
В/Irkutsk/365/2012		L			K		K	P		
В/Irkutsk/394/2012			K		K		K	P		
В/Irkutsk/473/2012					K		K	P		R
В/Irkutsk/489/2012					K		K	P		R
В/Magadan/478/2012					K		K	P		
В/Magadan/515/2012					K		K	P		
В/Novosibirsk/74/2012	V				K		K	P		
В/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012				T	K		K	P		

Также обнаружена аминокислотная замена G528R в двух штаммах из пяти, выделенных в Иркутске - В/Irkutsk/473/2012 и В/Irkutsk/489/2012. Кроме того, в отдельных штаммах обнаружены спорадические аминокислотные замены I7V, S9L, Q21K, K56T, L427I.

Ключевые аминокислотные замены N75K, N165K и S172P позволяют отнести все исследованные последовательности HA к подгруппе 1A генетической клады 1 (B/Brisbane/60-подобные вирусы) линии B/Victoria.

*Изменчивость HA штаммов генетической линии B/Yamagata*

Последовательности HA вакцинного штамма B/Florida/4/2006 и референс-штамма B/Wisconsin/01/2010 были включены в матрицу попарных генетических дистанций (табл. 28) для оценки эволюционного расстояния между эталонными антигенно отличными штаммами. Попарные эволюционные дистанции между HA референс-штаммов равны 0,0257 на нуклеотидном уровне и 0,0123 – на аминокислотном.

Таблица 28. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей HA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа B генетической линии B/Yamagata, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.

	B/Florida/4/2006	B/Wisconsin/01/2010	B/Novosibirsk/34/2012	B/Omsk/7/2012	B/Vladivostok/103/2012	B/Vladivostok/693/2012
	Аминокислотные последовательности					
B/Florida/4/2006		0,0123	0,0177	0,0177	0,0177	0,0177
B/Wisconsin/01/2010	0,0257		0,0053	0,0088	0,0053	0,0053
B/Novosibirsk/34/2012	0,0288	0,0041		0,0141	0,0000	0,0000
B/Omsk/7/2012	0,0300	0,0100	0,0130		0,0141	0,0141
B/Vladivostok/103/2012	0,0282	0,0035	0,0006	0,0124		0,0000
B/Vladivostok/693/2012	0,0282	0,0035	0,0006	0,0124	0,0000	
	Нуклеотидные последовательности					

Согласно матрице попарных генетических дистанций, последовательности HA исследованных штаммов B/Vladivostok/103/2012 и B/Vladivostok/693/2012 идентичны между собой как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне. Кроме того, эти штаммы по аминокислотной последовательности HA идентичны штамму B/Novosibirsk/34/2012. По генетической структуре HA штаммы из Новосибирска и Владивостока также близки друг к другу: дистанция составляет 0,0006.

Из всех выделенных в эпидемическом сезоне 2011-2012 гг. штаммов по структуре HA выделяется штамм B/Omsk/7/2012, который более дистанцирован как от остальных исследованных штаммов, так и от актуального вакцинного штамма B/Wisconsin/01/2010. По первичной структуре гена HA эволюционное расстояние между штаммом B/Omsk/7/2012 и

штаммами, изолированными в Новосибирске и во Владивостоке, составило 0,0130 и 0,0124, а по аминокислотной последовательности дистанция равна 0,0141. Эволюционные дистанции между исследованными российскими изолятами и референс-штаммами составили на нуклеотидном уровне  $0,0288 \pm 0,0008$  от штамма В/Florida/4/2006 и  $0,0053 \pm 0,0027$  от штамма В/Wisconsin/01/2010. По аминокислотным последовательностям расстояние составило соответственно 0,0177 и  $0,0061 \pm 0,0015$ . Разброс значений относительно среднего в случае с эволюционной дистанцией от штамма В/Wisconsin/01/2010 обусловлен отдаленностью штамма В/Omsk/7/2012.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине (табл. 29), все штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. содержат по 6 замен, общих с актуальным вакцинным штаммом В/Wisconsin/01/2010 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма В/Florida/4/2006: K88R, S150I, N165Y, D196N, S229D, E478D. Из этих замен две расположены в антигенных сайтах ВА и ВВ2 и, вероятно, именно эти замены в первую очередь связаны с изменением антигенных свойств вирусов.

Таблица 29. Сравнительный анализ аминокислотных замен в НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам НА. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с вакцинным штаммом В/Wisconsin/01/2010, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

Антигенный сайт			BC	BA	BA	BB2	BB1							
Нумерация по Lee/40	29	88	116	150	154	165	172	196	202	229	251	298	312	478
	29	88	116	150	154	165	172	196	202	229	251	298	312	478
В/Florida/4/2006	V	K	N	S	A	N	L	D	N	S	M	K	E	E
В/Wisconsin/01/2010		R		I		Y		N	S	D				D
В/Novosibirsk/34/2012		R	K	I		Y		N	S	D		E	K	D
В/Omsk/7/2012	A	R		I	T	Y	Q	N		D	V			D
В/Vladivostok/103/2012		R	K	I		Y		N	S	D		E	K	D
В/Vladivostok/693/2012		R	K	I		Y		N	S	D		E	K	D

В аминокислотной последовательности НА штаммов, выделенных в Новосибирске и Владивостоке, обнаружены замены, отличающие их от актуального вакцинного штамма В/Wisconsin/01/2010: N116K, K298E и E312K, при этом замена N116K локализована в антигеном сайте BC. Значительное количество (8, из которых 3 – в антигенных сайтах) аминокислотных замен обнаружено между штаммом В/Omsk/7/2012 и другими исследованными штаммами рассматриваемого эпидемического сезона. Аминокислотная замена в позиции 196 НА антигенного сайта ВВ1, обнаруженная во всех исследованных штаммах сезона 2011-2012 гг., обуславливала приобретение потенциального сайта гликозилирования НКТ<sub>196-198</sub>.

Аминокислотные замены N116K, S150I, N165Y, D196N, N202S, S229D, K298E и E312K являются характерными мутациями (WHO, 2013), позволяющими по структуре НА отнести содержащие их штаммы вируса гриппа В к генетической кладе 3 (В/Wisconsin/01-подобные) линии В/Yamagata. Исходя из наличия аминокислотных замен V29A, A172Q и M251V, штамм В/Omsk/7/2012 относится к иной ветви генетической клады 3 и близок к штамму В/Stockholm/12/2011, предложенному ВОЗ в качестве референс-штамма.

### Эпидемический сезон 2012-2013

Все исследованные штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. принадлежали к генетической линии В/Yamagata. Штамм В/Wisconsin/01/2010 был рекомендован ВОЗ в качестве вакцинного. В матрицу попарных эволюционных дистанций (табл. 30) в качестве референс-штаммов для оценки изменений, приводящих к смене вакцинного штамма, были включены В/Florida/4/2006 и В/Wisconsin/01/2010. Кроме того, исходя из различий между рассматриваемыми штаммами и штаммом В/Wisconsin/01/2010, в анализ также был включен референс-штамм 2012 гг. В/Massachusetts/02/2012 (позднее рекомендованный в состав вакцины вместо В/Wisconsin/01/2010).

Таблица 30. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг.

	В/Florida/4/2006	В/Wisconsin/01/2010	В/Massachusetts/02/2012	В/Novosibirsk/03/2013	В/Novosibirsk/LP/2013	В/Novosibirsk/05/2013
	Аминокислотные последовательности					
В/Florida/4/2006		0,0123	0,0105	0,0158	0,0140	0,0140
В/Wisconsin/01/2010	0,0257		0,0141	0,0159	0,0141	0,0141
В/Massachusetts/02/2012	0,0251	0,0220		0,0052	0,0035	0,0035
В/Novosibirsk/03/2013	0,0275	0,0220	0,0071		0,0017	0,0017
В/Novosibirsk/LP/2013	0,0269	0,0214	0,0065	0,0006		0,0000
В/Novosibirsk/05/2013	0,0263	0,0220	0,0059	0,0012	0,0006	
	Нуклеотидные последовательности					

Между НА референс-штаммов эволюционные дистанции составили:

- по нуклеотидным последовательностям:

В/Florida/4/2006, В/Wisconsin/01/2010 – 0,0257

B/Florida/4/2006, B/Massachusetts/02/2012 – 0,0251

B/Wisconsin/01/2010, B/Massachusetts/02/2012 – 0,0220

- по аминокислотным последовательностям:

B/Florida/4/2006, B/Wisconsin/01/2010 – 0,0123

B/Florida/4/2006, B/Massachusetts/02/2012 – 0,0105

B/Wisconsin/01/2010, B/Massachusetts/02/2012 – 0,0141.

Т.е. референс-штамм 2012 г. B/Massachusetts/02/2012 эволюционно значительно дистанцирован от актуального вакцинного штамма B/Wisconsin/01/2010.

Согласно матрице попарных дистанций, исследованные сибирские штаммы характеризуются незначительными отличиями между последовательностями НА как на нуклеотидном (дистанции равны 0,0006 и 0,0012), так и на аминокислотном уровне (0,0017). Более того, аминокислотные последовательности НА штаммов B/Novosibirsk/LP/2013 и B/Novosibirsk/05/2013 идентичны между собой.

На нуклеотидном уровне средние значения эволюционных дистанций между НА новосибирских штаммов и вакцинных штаммов составляют  $0,0269 \pm 0,0005$  от штамма B/Florida/4/2006 и  $0,0218 \pm 0,0003$  от штамма B/Wisconsin/01/2010, а на аминокислотном уровне соответственно  $0,0146 \pm 0,0008$  и  $0,0147 \pm 0,0008$ . При этом как генетические, так и аминокислотные дистанции между исследованными штаммами и штаммом B/Massachusetts/02/2012 (рекомендован ВОЗ в качестве вакцинного на эпидемический сезон 2013-2014 в феврале 2013 г. (WHO, 2013)) значительно меньше:  $0,0065 \pm 0,0005$  и  $0,0041 \pm 0,0008$ . Т.е. исследованные штаммы по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям НА значительно дистанцированы от вакцинных штаммов B/Florida/4/2006 (предыдущий вакцинный штамм) и B/Wisconsin/01/2010 (актуальный вакцинный штамм, рекомендованный ВОЗ на эпидемический сезон 2012-2013 в феврале 2012 г. (WHO, 2013)) и схожи со штаммом B/Massachusetts/02/2012.

Согласно анализу аминокислотных замен в гемагглютинине (табл. 31), штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. содержат по 2 замены, общих с актуальным вакцинным штаммом B/Wisconsin/01/2010 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма B/Florida/4/2006: K88R и S229D (кроме штамма B/Novosibirsk/03/2013, дополнительно содержащего замену M557V). Обнаружено по 4 аминокислотных замены, общих для всех исследованных штаммов сезона и отличающих их от вакцинных штаммов B/Florida/4/2006 и B/Wisconsin/01/2010: R48K, P108A, T181A и S/D229G. Из этих замен две локализованы в антигенных сайтах и могут быть связаны с изменением антигенных свойств вирусов. Две аминокислотные замены – T121S и D196N отличают новосибирские штаммы от наиболее

близкого к ним референс-штамма, использованного для сравнительного анализа - В/Massachusetts/02/2012.

Таблица 31. Сравнительный анализ аминокислотных замен в НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам НА. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с вакцинным штаммом В/Massachusetts/02/2012, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

Антигенные сайты	BC			BD	BA	BB2	BD	BB1				
Нумерация по В/Lee/40	48	88	108	121	150	165	181	196	202	229	478	557
Нумерация по В/Florida/4/2006	48	88	108	121	150	165	181	196	202	229	478	557
В/Florida/4/2006	R	K	P	T	S	N	T	D	N	S	E	M
В/Wisconsin/01/2010		R			I	Y		N	S	D	D	
В/Massachusetts/02/2012	K	R	A				A			G	D	
В/Novosibirsk/03/2013	K	R	A	S			A	N		G	D	V
В/Novosibirsk/05/2013	K	R	A	S			A	N		G	D	
В/Novosibirsk/LP/2013	K	R	A	S			A	N		G	D	

Аминокислотная замена в позиции 196 НА (антигенный сайт BB1), обнаруженная во всех исследованных штаммах сезона 2012-2013 гг. обуславливала приобретение потенциального сайта гликозилирования NKT<sub>196-198</sub>.

### 3.2.2 Молекулярно-генетический анализ изменчивости НА сезонных (эпидемических) изолятов вируса гриппа В, выделенных на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.

#### Эпидемический сезон 2008-2009.

Эволюционные дистанции между референс-последовательностями (НА штаммов В/Malaysia/2506/2004 и В/Brisbane/60/2008) равны 0,0225 и 0,0263 на нуклеотидном и аминокислотном уровне, соответственно (табл. 32). Т.е. изменчивость НА, соответствующую этим значениям, можно считать достаточной для смены вакцинного штамма.

Последовательности НА штаммов вируса гриппа, выделенных в эпидемический сезон 2008-2009 гг., характеризуются высокой степенью взаимной идентичности как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровнях. Из 5 штаммов, изолированных в Новосибирске, 4 идентичны по последовательности НА (как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне) – эволюционные дистанции равны 0,0000. Исключением является штамм В/Novosibirsk/50/2009, который хотя и незначительно (относительно эволюционных дистанций в паре референс-штаммов), но все же дистанцирован от других штаммов эпидемического сезона (эволюционные расстояния равны 0,0007 по нуклеотидной последовательности НА и 0,0022 – по аминокислотной).

Таблица 32. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг..

	V/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008	B/Novosibirsk/24/2009	B/Novosibirsk/36/2009	B/Novosibirsk/42/2009	B/Novosibirsk/50/2009	B/Novosibirsk/715/2009
	Аминокислотные последовательности						
V/Malaysia/2506/2004		0,0263	0,0263	0,0263	0,0263	0,0285	0,0263
B/Brisbane/60/2008	0,0225		0,0044	0,0044	0,0044	0,0065	0,0044
B/Novosibirsk/24/2009	0,0210	0,0043		0,0000	0,0000	0,0022	0,0000
B/Novosibirsk/36/2009	0,0210	0,0043	0,0000		0,0000	0,0022	0,0000
B/Novosibirsk/42/2009	0,0210	0,0043	0,0000	0,0000		0,0022	0,0000
B/Novosibirsk/50/2009	0,0218	0,0050	0,0007	0,0007	0,0007		0,0022
B/Novosibirsk/715/2009	0,0210	0,0043	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	
	Нуклеотидные последовательности						

Отличия нуклеотидной последовательности NA исследованных штаммов от NA вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 более выражены ( $0,0044 \pm 0,0003$  и  $0,0048 \pm 0,0009$ ). При этом генетические дистанции между анализируемыми последовательностями и NA предыдущего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004 значительно превышают эти показатели ( $0,0212 \pm 0,0003$  и  $0,0268 \pm 0,0009$ ) и схожи с эволюционными расстояниями в паре вакцинных штаммов. Т.е. все исследованные штаммы по первичной структуре NA значительно отличаются от штамма В/Malaysia/2506/2004, ранее входившего в состав вакцины, и схожи с вакцинным штаммом В/Brisbane/60/2008.

Согласно анализу аминокислотных замен в нейраминидазе (табл. 33), все штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. содержат 11 замен, общих с штаммом В/Brisbane/60/2008 и отличающих их от предыдущего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004. Штамм В/Novosibirsk/50/2009 по аминокислотной последовательности NA отличается от других штаммов эпидемического сезона всего одной заменой – М403I.



Таблица 33. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам NA. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с вакцинным штаммом В/Brisbane/60/2008, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	41	42	125	204	220	271	320	329	358	373	378	403	404	463
В/Malaysia/2506/2004	P	S	K	I	N	I	E	D	A	K	G	M	E	N
В/Brisbane/60/2008	S	P	N	V	K	V	D	N	E	E			K	D
В/Novosibirsk/24/2009	S	P	N	V	K	V	D	N	E	E	E		K	
В/Novosibirsk/36/2009	S	P	N	V	K	V	D	N	E	E	E		K	
В/Novosibirsk/42/2009	S	P	N	V	K	V	D	N	E	E	E		K	
В/Novosibirsk/50/2009	S	P	N	V	K	V	D	N	E	E	E	I	K	
В/Novosibirsk/715/2009	S	P	N	V	K	V	D	N	E	E	E		K	

Аминокислотные замены P41S, K125N, I204V, N220K, E320D, E404K и A358E являются ключевыми заменами, обуславливающими принадлежность NA исследованных штаммов вируса гриппа В эпидемического сезона 2008-2009 гг. к генетической кладе 1А (В/Brisbane/60-подобные) линии В/Victoria (WHO, 2009).

#### Эпидемический сезон 2010-2011

По рекомендации ВОЗ в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. в качестве вакцинного штамма вируса гриппа В все еще использовался В/Brisbane/60/2008. Следовательно, и в матрице попарных эволюционных дистанций (табл. 34) состав референс-штаммов остался прежним: В/Malaysia/2506/2004 и В/Brisbane/60/2008.

Последовательности (нуклеотидные и аминокислотные) NA штаммов вируса гриппа, изолированных в эпидемический сезон 2010-2011 гг., характеризуются полной идентичностью в пределах основного региона выделения (Новосибирская область) – эволюционные дистанции равны 0,0000.

Примечательно, что равны нулю дистанции между NA штаммов, выделенных в различных населенных пунктах Новосибирской области – в г. Новосибирске и в р.п. Кольцово.

Последовательности NA штаммов, выделенных в других регионах (В/Tomsk/12/2011 и В/Yekaterinburg/129/2011), значительно (относительно изолятов, выделенных в Новосибирской области) дистанцированы от остальных штаммов эпидемического сезона как на нуклеотидном (0,0087), так и на аминокислотном (0,0153) уровнях.

Таблица 34. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных на территории азиатской части РФ ( 2010-2011 гг.)

	B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008	B/Novosibirsk/01/2010	B/Novosibirsk/04/2010	B/Novosibirsk/01/2011	B/Novosibirsk/02/2011	B/Novosibirsk/03/2011	B/Novosibirsk/04/2011	B/Novosibirsk/05/2011	B/Novosibirsk/08/2011	B/Novosibirsk/09/2011	B/Novosibirsk/07k/2011	B/Novosibirsk/12k/2011	B/Novosibirsk/29k/2011	B/Novosibirsk/91k/2011	B/Tomsk/12/2011	B/Yekaterinburg/129/2011
	Аминокислотные последовательности																
B/Malaysia/2506/2004		0,0263	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0374	0,0375	0,0307
B/Brisbane/60/2008	0,0225		0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0153	0,0087
B/Novosibirsk/01/2010	0,0270	0,0086		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/04/2010	0,0270	0,0086	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/01/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/02/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/03/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/04/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/05/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/08/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/09/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/07k/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/12k/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/29k/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0000	0,0087	0,0153
B/Novosibirsk/91k/2011	0,0270	0,0086	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0087	0,0153
B/Tomsk/12/2011	0,0270	0,0101	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057	0,0057		0,0153
B/Yekaterinburg/129/2011	0,0248	0,0079	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	0,0108	
	Нуклеотидные последовательности																

В эпидемическом сезоне 2010-2011 гг. выявлено увеличение эволюционных дистанций между NA исследованных российских штаммов и вакцинных штаммов В/Malaysia/2506/2004 и В/Brisbane/60/2008 относительно предпандемического сезона 2008-2009 гг., что свидетельствует о накоплении замен и генетическом дрейфе.

Согласно анализу аминокислотных замен в нейраминидазе (табл. 35), все штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. содержат по 11 замен, общих со штаммом В/Brisbane/60/2008 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004. В отдельных штаммах, обнаружены спорадические аминокислотные замены I120V, R257Q, R315K и A395T относительно штаммов В/Malaysia/2506/2004 и В/Brisbane/60/2008.

Также обнаружены аминокислотные замены, отличающие исследованные штаммы от вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 и встречающиеся во всех штаммах, выделенных на территории Новосибирской области: S27L, L38P, P51S, L73F, P76S и N199D. За исключением двух (L38P и P76S) эти аминокислотные замены также найдены в нейраминидазе штамма В/Tomsk/12/2011, а в штамме В/Yekaterinburg/129/2011 обнаружена всего одна замена, характерная для других исследованных штаммов эпидемического сезона 2010-2011 гг. - L73F.

В целом же наличие перечисленных аминокислотных замен, отличающих NA исследованных штаммов от В/Brisbane/60/2008 позволяет отнести их к генетической группе 1В клады Brisbane/60 линии Victoria/208.

Таблица 35. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам NA. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с вакцинным штаммом В/Brisbane/60/2008, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	27	38	41	42	51	73	76	120	125	199	204	220	257	271	315	320	329	358	373	395	404	463
B/Malaysia/2506/2004	S	L	P	S	P	L	P	I	K	N	I	N	R	I	R	E	D	A	K	A	E	N
B/Brisbane/60/2008			S	P					N		V	K		V		D	N	E	E		K	D
B/Novosibirsk/01/2010	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/04/2010	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/01/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/02/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/03/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/04/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/05/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/08/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/09/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/07k/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/12k/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/29k/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Novosibirsk/91k/2011	L	P	S	P	S	F	S		N	D	V	K		V		D		E	E		K	D
B/Tomsk/12/2011	L		S	P	S	F		V	N	D	V	K	Q	V		D		E	E		K	D
B/Yekaterinburg/129/2011			S	P		F			N		V	K		V	K	D		E	E	T	K	D

## **Эпидемический сезон 2011-2012**

### *Изменчивость NA штаммов генетической линии B/Victoria*

В течение эпидемического сезона 2011-2012 гг. в составе вакцины был оставлен штамм B/Brisbane/60/2008. Как и для двух ранее рассмотренных эпидемических сезонов, в матрице попарных эволюционных дистанций (табл. 36) в качестве антигенно различных референс-штаммов использовались B/Malaysia/2506/2004 (как предыдущий вакцинный штамм) и B/Brisbane/60/2008 (как актуальный вакцинный штамм).

Пул последовательностей (нуклеотидных и аминокислотных) NA штаммов вируса гриппа, выделенных в эпидемический сезон 2011-2012 гг. характеризуется гетерогенностью. Попарные эволюционные дистанции в среднем составляют  $0,0034 \pm 0,0016$  для нуклеотидных последовательностей и  $0,0052 \pm 0,0028$  – для аминокислотных. Величина стандартного отклонения указывает на значительный разброс значений попарных дистанций.

По последовательности NA, из пяти штаммов, выделенных в Иркутске, две пары - B/Irkutsk/292/2012 и B/Irkutsk/365/2012, а также B/Irkutsk/473/2012 и B/Irkutsk/489/2012 полностью идентичны на нуклеотидном и аминокислотном уровнях. А нейраминидазы штаммов B/Magadan/478/2012 и B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012 характеризуются одинаковыми аминокислотными последовательностями.

Эволюционные расстояния между NA российских изолятов и предыдущего вакцинного штамма B/Malaysia/2506/2004 в среднем составляют  $0,0264 \pm 0,0009$  для нуклеотидных последовательностей и  $0,0341 \pm 0,0024$  для аминокислотных последовательностей и схожи со значениями, показанными для штаммов предыдущего эпидемического сезона. А дистанции от актуального вакцинного штамма B/Brisbane/60/2008 равны  $0,0081 \pm 0,0009$  по нуклеотидным последовательностям и  $0,0100 \pm 0,0023$  – по аминокислотным. Относительно предыдущего эпидемического сезона на аминокислотном уровне произошло уменьшение эволюционного расстояния от одного и того же вакцинного штамма при схожих генетических дистанциях. Таким образом, исследованные штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. по сравнению со штаммами предыдущего сезона характеризовались накоплением синонимичных нуклеотидных замен относительно штамма B/Brisbane/60/2008 и снижением числа несинонимичных.

Таблица 36. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.

	B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008	B/Irkutsk/292/2012	B/Irkutsk/365/2012	B/Irkutsk/394/2012	B/Irkutsk/473/2012	B/Irkutsk/489/2012	B/Magadan/478/2012	B/Magadan/515/2012	B/Novosibirsk/74/2012	B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012
2011-2012	Аминокислотные последовательности										
B/Malaysia/2506/2004	-	0.0392	0.0592	0.0592	0.0512	0.0551	0.0551	0.0472	0.0512	0.0512	0.0472
B/Brisbane/60/2008	0.0225	-	0.0235	0.0235	0.0156	0.0195	0.0195	0.0117	0.0196	0.0156	0.0117
B/Irkutsk/292/2012	0.0277	0.0093	-	0.0000	0.0078	0.0117	0.0117	0.0117	0.0196	0.0156	0.0117
B/Irkutsk/365/2012	0.0277	0.0093	0.0000	-	0.0078	0.0117	0.0117	0.0117	0.0196	0.0156	0.0117
B/Irkutsk/394/2012	0.0254	0.0072	0.0021	0.0021	-	0.0039	0.0039	0.0039	0.0117	0.0078	0.0039
B/Irkutsk/473/2012	0.0262	0.0079	0.0029	0.0029	0.0007	-	0.0000	0.0078	0.0156	0.0117	0.0078
B/Irkutsk/489/2012	0.0262	0.0079	0.0029	0.0029	0.0007	0.0000	-	0.0078	0.0156	0.0117	0.0078
B/Magadan/478/2012	0.0247	0.0064	0.0043	0.0043	0.0021	0.0029	0.0029	-	0.0078	0.0039	0.0000
B/Magadan/515/2012	0.0262	0.0079	0.0057	0.0057	0.0036	0.0043	0.0043	0.0014	-	0.0117	0.0078
B/Novosibirsk/74/2012	0.0269	0.0086	0.0050	0.0050	0.0029	0.0036	0.0036	0.0036	0.0050	-	0.0039
B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012	0.0262	0.0079	0.0057	0.0057	0.0036	0.0043	0.0043	0.0029	0.0043	0.0050	-
	Нуклеотидные последовательности										

Согласно анализу аминокислотных замен в нейраминидазе (табл. 37), все штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. содержат по 11 ранее описанных для предыдущих сезонов замен, общих с штаммом В/Brisbane/60/2008 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004.

Таблица 37. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам NA. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с вакцинным штаммом В/Brisbane/60/2008, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	36	41	42	75	88	125	189	199	204	220	271	295	320	329	340	358	373	395	404	463
В/Malaysia/2506/2004	I	P	S	L	P	K	T	N	I	N	I	S	E	D	N	A	K	A	E	N
В/Brisbane/60/2008		S	P			N			V	K	V		D	N		E	E		K	D
В/Irkutsk/292/2012	M	S	P			N		K	V	K	V	R	D	N	D	K	E	T	K	D
В/Irkutsk/365/2012	M	S	P			N		K	V	K	V	R	D	N	D	K	E	T	K	D
В/Irkutsk/394/2012		S	P			N			V	K	V	R	D	N	D	K	E	T	K	D
В/Irkutsk/473/2012		S	P	P		N			V	K	V	R	D	N	D	K	E	T	K	D
В/Irkutsk/489/2012		S	P	P		N			V	K	V	R	D	N	D	K	E	T	K	D
В/Magadan/478/2012		S	P			N			V	K	V	R	D	N	D	K	E		K	D
В/Magadan/515/2012		S	P			N	I		V	E	V	R	D	N	D	K	E		K	D
В/Novosibirsk/74/2012		S	P		Q	N			V	K	V	R	D	N	D	K	E		K	D
В/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012		S	P			N			V	K	V	R	D	N	D	K	E		K	D

Обнаружены аминокислотные замены, общие для исследованных штаммов и отличающие их от вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008: S295R, N340D и E358K. Кроме того штаммы, выделенные в Иркутске, характеризуются высокой (относительно других исследованных штаммов) гетерогенностью NA: содержат общую замену A395T, а также замены I36M и N199K в штаммах В/Irkutsk/292/2012, В/Irkutsk/365/2012 и L75P в штаммах В/Irkutsk/473/2012 и В/Irkutsk/489/2012. Штаммы же изолированные на территории Магадана, Новосибирска и Южно-Сахалинска отличаются только спорадическими аминокислотными заменами P88Q и T189I.

Ключевые аминокислотные замены S295R, N340D и E358K позволяют отнести все исследованные последовательности NA к подгруппе 1А генетической клады 1 (В/Brisbane/60-подобные вирусы) линии В/Victoria.

#### *Изменчивость NA штаммов генетической линии В/Yamagata*

Последовательности NA вакцинного штамма В/Florida/4/2006 и референс-штамма В/Wisconsin/01/2010 были включены в матрицу попарных генетических дистанций (табл. 38) для оценки эволюционного расстояния между эталонными антигенно отличными штаммами. Попарные эволюционные дистанции между NA референс-штаммов равны 0,0137 на нуклеотидном уровне и 0,0153 – на аминокислотном.

Таблица 38. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NA вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.

	В/Florida/4/2006	В/Wisconsin/01/2010	В/Novosibirsk/34/2012	В/Omsk/7/2012	В/Vladivostok/103/2012	В/Vladivostok/693/2012
	Аминокислотные последовательности					
В/Florida/4/2006		0,0153	0,0153	0,0219	0,0175	0,0197
В/Wisconsin/01/2010	0,0137		0,0000	0,0065	0,0022	0,0044
В/Novosibirsk/34/2012	0,0167	0,0043		0,0065	0,0022	0,0044
В/Omsk/7/2012	0,0174	0,0065	0,0094		0,0087	0,0109
В/Vladivostok/103/2012	0,0167	0,0043	0,0014	0,0094		0,0022
В/Vladivostok/693/2012	0,0174	0,0050	0,0021	0,0101	0,0007	
	Нуклеотидные последовательности					

По последовательности NA штамм В/Novosibirsk/34/2012 на аминокислотном уровне идентичен актуальному вакцинному штамму В/Wisconsin/01/2010: эволюционная дистанция между последовательностями равна 0,0000. В остальном пул исследованных штаммов характеризуется гетерогенностью – изоляты дистанцированы друг от друга. Эволюционные расстояния между NA российских штаммов равны  $0,0055 \pm 0,0041$  по нуклеотидным последовательностям и  $0,0058 \pm 0,0033$  – по аминокислотным. Величина стандартного отклонения указывает на значительный разброс значений, обусловленный включением в матрицу попарных эволюционных дистанций последовательности NA штамма В/Omsk/7/2012, который в наибольшей степени дистанцирован от остальных исследованных штаммов эпидемического сезона. Попарные дистанции между штаммом В/Omsk/7/2012 и другими российскими изолятами составляют в среднем  $0,0096 \pm 0,0003$  (нуклеотидные последовательности) и  $0,0087 \pm 0,0018$  (аминокислотные последовательности).

Эволюционные дистанции между исследованными российскими изолятами и референс-штаммами составили на нуклеотидном уровне  $0,0170 \pm 0,0004$  от штамма В/Florida/4/2006 и  $0,0050 \pm 0,0009$  от штамма В/Wisconsin/01/2010. По аминокислотным последовательностям расстояние составило соответственно  $0,0186 \pm 0,0025$  и  $0,0033 \pm 0,0024$ . Величина стандартного отклонения для эволюционных дистанций между аминокислотными последовательностями NA российских изолятов и В/Wisconsin/01/2010 формируется за счет учета в анализе штамма В/Novosibirsk/34/2012, NA которого на аминокислотном уровне идентична NA референс-



штамма. В целом, относительно «эталонных» попарных дистанций между антигенно различными референс-штаммами, российские изоляты эпидемического сезона значительно дистанцированы от вакцинного штамма В/Florida/4/2006 и схожи со штаммом В/Wisconsin/01/2010.

Согласно анализу аминокислотных замен в нейраминидазе (табл. 39), все штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. содержат по 7 замен, общих со штаммом В/Wisconsin/01/2010 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма В/Florida/4/2006: Q42R, A68T, T125K, K186R, D340N, D463N и A465T.

Замены в позициях 463 и 465 NA всех исследованных штаммов обуславливают приобретение потенциального сайта гликозилирования NMT<sub>463-465</sub>. Аминокислотные замены A68T, T125K, K186R, D340N и Q42R являются характерными мутациями (WHO, 2013), позволяющими по структуре NA отнести содержащие их штаммы вируса гриппа В к генетической кладе 3 (В/Wisconsin/01-подобные) линии В/Yamagata. Исходя из наличия трех аминокислотных замен, отличающих штамм В/Omsk/7/2012 от других исследованных штаммов, он относится к иной ветви генетической клады 3 и близок к штамму В/Stockholm/12/2011, предложенному ВОЗ в качестве референс-штамма.

Таблица 39. Сравнительный анализ аминокислотных замен в NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам NA. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с вакцинным штаммом В/Wisconsin/01/2010, темно-серым – замены, отличающие российские штаммы от вакцинного и закрепившиеся в популяции.

	36	42	68	73	125	160	186	198	340	343	463	465
В/Florida/4/2006	I	Q	A	L	T	K	K	S	D	K	D	A
В/Wisconsin/01/2010		R	T		K		R		N		N	T
В/Novosibirsk/34/2012		R	T		K		R		N		N	T
В/Omsk/7/2012		R	T	P	K	R	R		N	E	N	T
В/Vladivostok/103/2012	M	R	T		K		R		N		N	T
В/Vladivostok/693/2012	M	R	T		K		R	N	N		N	T

### Эпидемический сезон 2012-2013

Все исследованные штаммы эпидемического сезона 2012-2013 принадлежат генетической линии В/Yamagata. Штамм В/Wisconsin/01/2010 был рекомендован ВОЗ в качестве вакцинного на эпидемический сезон 2012-2013 гг. В матрицу попарных эволюционных дистанций (табл. 40) в качестве референс-штаммов для оценки изменений, приводящих к смене вакцинного штамма были включены В/Florida/4/2006 и В/Wisconsin/01/2010. Кроме того, исходя из различий между штаммами эпидемического сезона 2012-2013 гг. и штаммом В/Wisconsin/01/2010, в анализ

также был включен референс-штамм 2012 г. В/Massachusetts/02/2012 (позднее включенный в состав вакцины).

Между НА референс-штаммов эволюционные дистанции составили:

- по нуклеотидным последовательностям:

В/Florida/4/2006, В/Wisconsin/01/2010 – 0,0137

В/Florida/4/2006, В/Massachusetts/02/2012 – 0,0115

В/Wisconsin/01/2010, В/Massachusetts/02/2012 – 0,0211

- по аминокислотным последовательностям:

В/Florida/4/2006, В/Wisconsin/01/2010 – 0,0153

В/Florida/4/2006, В/Massachusetts/02/2012 – 0,0087

В/Wisconsin/01/2010, В/Massachusetts/02/2012 – 0,0241.

Таким образом, референс-штамм 2012 г. В/Massachusetts/02/2012 эволюционно значительно дистанцирован от актуального вакцинного штамма В/Wisconsin/01/2010 и приближен к более раннему штамму В/Florida/4/2006.

Таблица 40. Матрица попарных дистанций для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей НА вакцинных штаммов вируса гриппа и штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных на территории азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг..

	В/Florida/4/2006	В/Wisconsin/01/2010	В/Massachusetts/02/2012	В/Novosibirsk/03/2013	В/Novosibirsk/LP/2013	В/Novosibirsk/05/2013
	Аминокислотные последовательности					
В/Florida/4/2006		0,0153	0,0087	0,0065	0,0065	0,0087
В/Wisconsin/01/2010	0,0137		0,0241	0,0219	0,0219	0,0241
В/Massachusetts/02/2012	0,0115	0,0211		0,0022	0,0022	0,0044
В/Novosibirsk/03/2013	0,0108	0,0203	0,0050		0,0000	0,0022
В/Novosibirsk/LP/2013	0,0101	0,0196	0,0043	0,0007		0,0022
В/Novosibirsk/05/2013	0,0115	0,0211	0,0057	0,0021	0,0014	
	Нуклеотидные последовательности					

Согласно матрице попарных дистанций последовательности НА исследованных штаммов характеризуются гетерогенностью на нуклеотидном уровне (эволюционные дистанции в среднем равны  $0,0014 \pm 0,0006$ ), и, в несколько меньшей степени (последовательности НА

штаммов В/Novosibirsk/03/2013 и В/Novosibirsk/LP/2013 идентичны) на аминокислотном (0,0022 между неидентичными последовательностями).

На нуклеотидном уровне средние значения эволюционных дистанций между НА новосибирских штаммов и вакцинных штаммов составляют  $0,0108 \pm 0,0006$  от штамма В/Florida/4/2006 и  $0,0203 \pm 0,0006$  от штамма В/Wisconsin/01/2010, а на аминокислотном уровне, соответственно,  $0,0073 \pm 0,0010$  и  $0,0227 \pm 0,0010$ . При этом как генетические, так и аминокислотные дистанции между исследованными штаммами и штаммом В/Massachusetts/02/2012 (рекомендован ВОЗ в качестве вакцинного на эпидемический сезон 2013-2014 в феврале 2013 г. (WHO, 2013)) значительно меньше:  $0,0050 \pm 0,0006$  и  $0,0029 \pm 0,0010$ . Таким образом, исследованные штаммы по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям НА значительно дистанцированы от вакцинного В/Wisconsin/01/2010 (актуальный вакцинный штамм, рекомендованный ВОЗ на эпидемический сезон 2012-2013 в феврале 2012 г. (WHO, 2013)) и схожи со штаммом В/Massachusetts/02/2012. При этом эволюционные дистанции от штамма В/Florida/4/2006 хотя и превышают аналогичную характеристику относительно штамма В/Massachusetts/02/2012, все же значительно уменьшились по сравнению с предыдущим эпидемическим сезоном.

Согласно анализу аминокислотных замен в нейраминидазе (табл. 41), штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. не содержат замен, общих с актуальным вакцинным штаммом В/Wisconsin/01/2010 и отличающих их от прежнего вакцинного штамма В/Florida/4/2006.

Таблица 41. Сравнительный анализ аминокислотных замен в НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг.. Указана принадлежность замен к антигенным сайтам НА. Белым цветом выделены спорадические замены, светло-серым – замены общие с вакцинным штаммом В/Massachusetts/02/2012.

	42	65	68	106	125	186	248	295	340	401	463	465
В/Florida/4/2006	Q	R	A	T	T	K	I	S	D	V	D	A
В/Wisconsin/01/2010	R		T		K	R			N		N	T
В/Massachusetts/02/2012		H		I			V	R				
В/Novosibirsk/03/2013				I			V	R				
В/Novosibirsk/05/2013				I			V	R				
В/Novosibirsk/LP/2013				I			V	R		I		

Обнаружено по 7 аминокислотных замен, общих для всех исследованных штаммов сезона и вакцинных штаммов В/Florida/4/2006 и В/Massachusetts/02/2012 (и отличающих их от вакцинного штамма В/Wisconsin/01/2010). Кроме того, обнаружены 3 аминокислотных замены характерных для штамма В/Massachusetts/02/2012: T106I, I248V и S295R, что позволяет отнести

исследованные штаммы по структуре NA к генетической кладе В/Massachusetts/02/2012 (клада 2).

### **3.2.3 Динамика изменчивости поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа В, изолированных на территории Азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг.**

#### **Изменчивость первичной структуры белка NA**

##### *Генетическая линия В/Victoria*

За три эпидемических сезона обнаружено 5 позиций, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. исключены спорадические замены) (табл. 42). Из этих замен – 3 в субъединице NA1. Две замены – в антигенных сайтах NA1, т.е. вероятно, ассоциированы с изменением антигенных свойств вирусов.

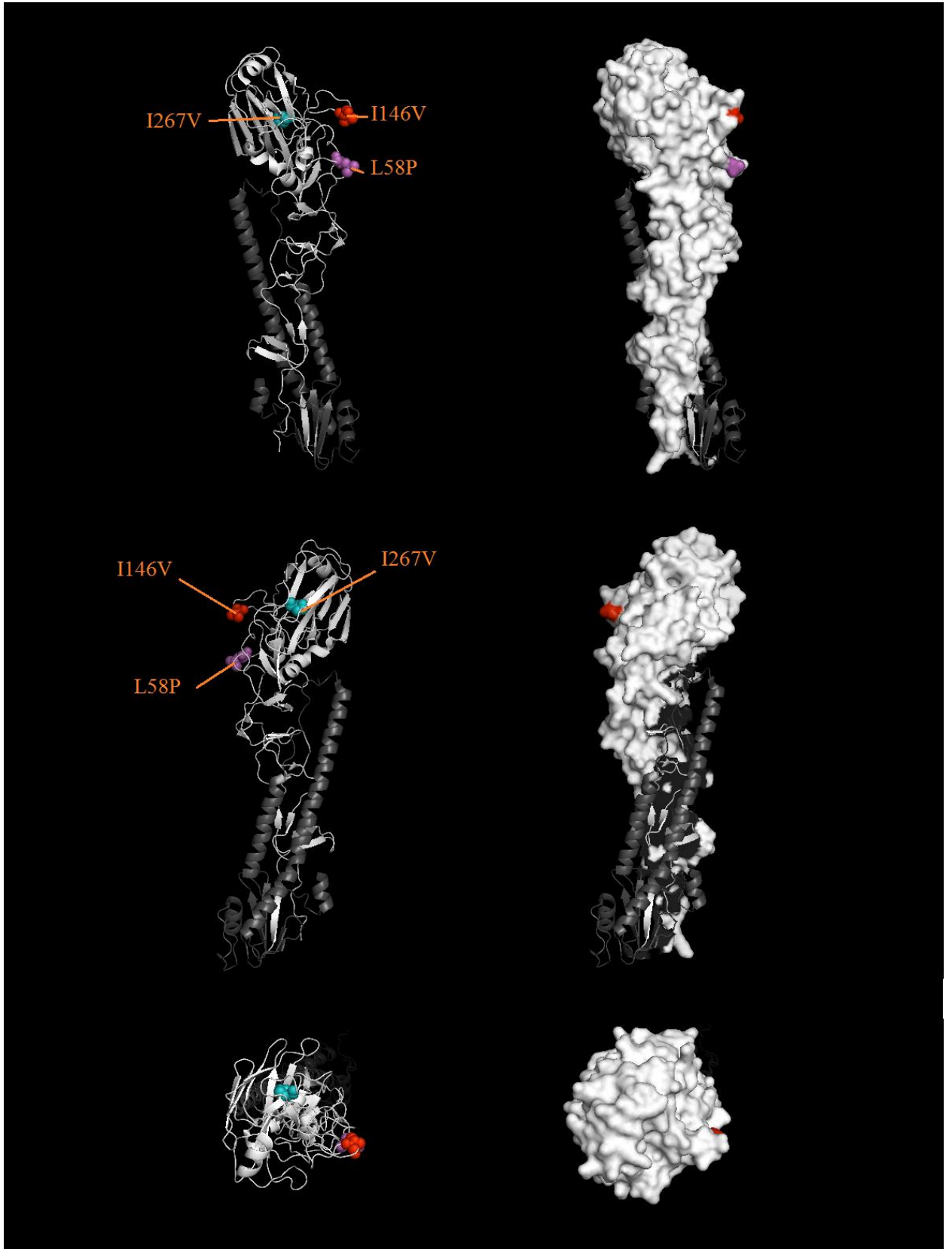
Три аминокислотных замены встречаются во всех исследованных штаммах и являются заменами, характерными для генетической клады В/Brisbane/60/2008. Наибольшей гетерогенностью аминокислотных последовательностей NA отличаются штаммы, выделенные в эпидемический сезон 2010-2011, несмотря на то, что большинство из них было изолировано в одном географическом регионе. В аминокислотных последовательностях NA исследованных штаммов за рассмотренные эпидемические сезоны обнаружены варибельные позиции, в которых со сменой эпидемического сезона происходят замены аминокислот. Так, в NA штаммов сезона 2010-2011 произошла аминокислотная замена L58P, не обнаруженная в штаммах сезона 2011-2012.

Таблица 42. Позиции в НА, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинных штаммов, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов. Красный цвет – позиции замен в антигенном сайте ВА, фиолетовый - ВЕ. Светло-серый цвет - замены, закрепившиеся более чем на один эпидемический сезон.

Антигенный сайт	BE	BA				
Нумерация по B/Lee/40	58	146	266	*	527	558
	58	146	267	*	528	559
<b>B/Brisbane/60/2008</b>	L	I	I	*	G	V
B/Novosibirsk/24/2009				*		
B/Novosibirsk/36/2009				*		
B/Novosibirsk/42/2009				*		
B/Novosibirsk/50/2009				*		
B/Novosibirsk/715/2009				*		
B/Novosibirsk/01/2010	P	V		*		
B/Novosibirsk/04/2010	P	V		*		
B/Novosibirsk/01/2011	P	V		*		I
B/Novosibirsk/02/2011	P	V		*		I
B/Novosibirsk/03/2011	P	V		*		I
B/Novosibirsk/04/2011	P	V	V	*		
B/Novosibirsk/05/2011	P	V		*		I
B/Novosibirsk/08/2011	P	V	V	*		
B/Novosibirsk/09/2011	P	V		*		
B/Novosibirsk/07k/2011	P	V		*		
B/Novosibirsk/12k/2011	P	V		*		
B/Novosibirsk/29k/2011	P	V		*		I
B/Novosibirsk/91k/2011	P	V		*		I
B/Tomsk/12/2011	P	V		*		
B/Yekaterinburg/129/2011	P	V		*		
B/Irkutsk/292/2012		V		*		
B/Irkutsk/365/2012		V		*		
B/Irkutsk/394/2012		V		*		
B/Irkutsk/473/2012		V		*	R	
B/Irkutsk/489/2012		V		*	R	
B/Magadan/478/2012		V		*		
B/Magadan/515/2012		V		*		
B/Novosibirsk/74/2012(НА)		V		*		
B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012		V		*		

Чтобы получить представление о пространственной локализации аминокислотных замен была использована трехмерная модель НА вируса гриппа типа В (рис. 24).

Рисунок 24. Аминокислотные замены в HA1 штаммов вируса гриппа В генетической линии Victoria, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. Различные цвета указывают на принадлежность мутаций к отдельным антигенным сайтам: красный – ВА, фиолетовый – ВЕ, голубой – позиция аминокислотной замены не относится к антигенным сайтам.



На 3D модели аминокислотные замены в положениях 58 и 146 расположены на поверхности глобулы, что соответствует их принадлежности к антигенным сайтам (BE и BA) и позволяет предполагать влияние на антигенные характеристики штаммов. Замена в I267V не видна на поверхности HA, что коррелирует с тем, что позиция 267 HA вируса гриппа В не относится к антигенным сайтам и не оказывает влияния на антигенные характеристики.

*Генетическая линия В/Yamagata*

За два эпидемических сезона обнаружено 11 позиций в гемагглютинине, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинных штаммов (начиная со штамма В/Wisconsin/01/2010), при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. исключены спорадические замены) (табл. 43).

Все замены локализуются в субъединице HA1 (антигенно активная субъединица), из них 6 – в антигенных сайтах, т.е. штаммы двух последовательных эпидемических сезонов отличаются по 6 положениям аминокислотных замен, расположенным в антигенных сайтах. Вероятно, замены именно в этих положениях связаны с изменением антигенных свойств вирусов и коррелируют со сменой состава вакцины (по рекомендации ВОЗ штамм В/Wisconsin/01/2010 был заменен на В/Massachusetts/02/2012).

Таблица 43. Позиции в HA, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинных штаммов, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов. Серый цвет – замены, встречающиеся в штаммах двух эпидемических сезонов.

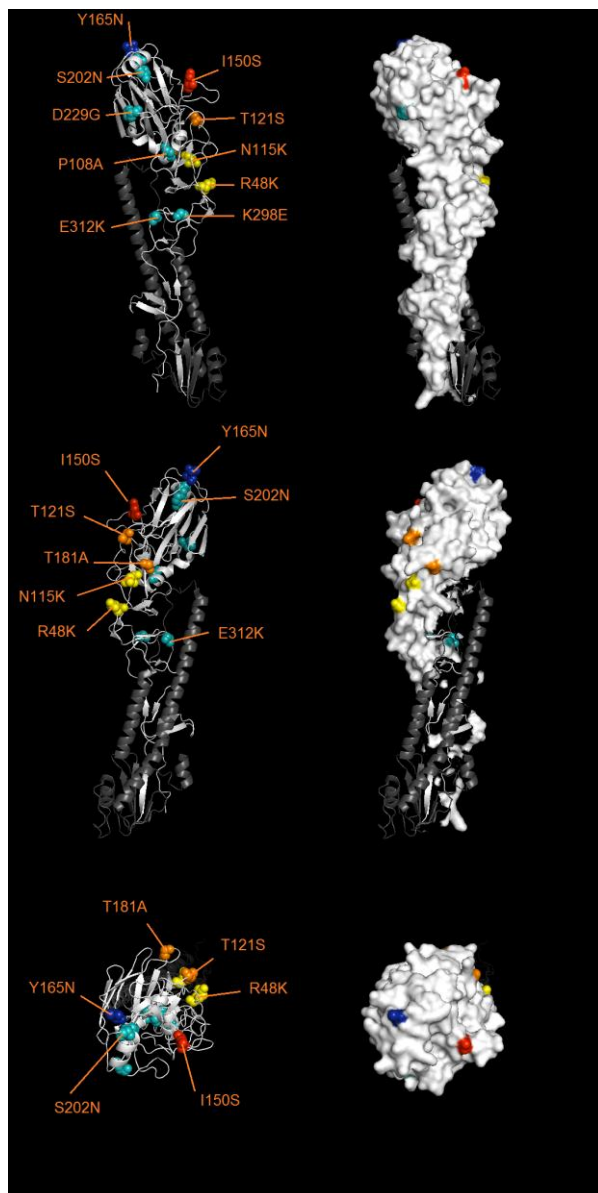
Антигенный сайт	BC		BC	BD	BA	BB2	BD				
	48	108	116	121	150	165	181	202	229	298	312
<b>В/Wisconsin/01/2010</b>	R	P	N	T	I	Y	T	S	D	K	E
В/Novosibirsk/34/2012			K							E	K
В/Omsk/7/2012								N			
В/Vladivostok/103/2012			K							E	K
В/Vladivostok/693/2012			K							E	K
<b>В/Massachusetts/02/2012</b>	K	A			S	N	A	N	G		
В/Novosibirsk/03/2013	K	A		S	S	N	A	N	G		
В/Novosibirsk/05/2013	K	A		S	S	N	A	N	G		
В/Novosibirsk/LP/2013	K	A		S	S	N	A	N	G		

Рассматривая динамику появления характерных (встречающихся в нескольких штаммах) для отдельных эпидемических сезонов аминокислотных замен в HA, можно отметить, что в пределах отдельных сезонов паттерны распределения замен характеризуются низкой вариабельностью. За исключением штамма В/Omsk/7/2012, который не содержит аминокислотных замен, характерных для всех других изолятов эпидемического сезона 2011-2012 гг.

Замена S202N в штамме В/Omsk/7/2012 в дальнейшем была обнаружена в НА штаммов эпидемического сезона 2012-2013 гг. Кроме того, замены в положениях 116 (в антигенном сайте ВС), 298 и 312, отличавшие НА штамма В/Omsk/7/2012 от НА других штаммов эпидемического сезона 2011-2012 гг., были характерны для всех штаммов следующего эпидемического сезона. В целом же эпидемические сезоны значительно отличаются по паттернам распределения аминокислотных замен, что коррелирует с дальнейшими изменениями в составе вакцины.

Согласно модели (рис. 25) пространственной структуры, аминокислотные замены в антигенных сайтах ожидаемо локализируются на поверхности НА, что позволяет предполагать их потенциальное влияние на антигенные свойства вирусов.

Рисунок 25. Аминокислотные замены в НА1 штаммов вируса гриппа В генетической линии Yamagata. Различные цвета указывают на принадлежность мутаций к отдельным антигенным сайтам: красный – ВА, зеленый – ВВ1, синий – ВВ2, желтый – ВС, оранжевый – ВD, фиолетовый – ВЕ, голубой – позиция аминокислотной замены не относится к антигенным сайтам.





Замены, не относящиеся к антигенным сайтам, за исключением мутаций в положениях 229, на модели расположены в глобуле НА, что снижает вероятность их вовлеченности в изменение антигенных характеристик.

### Филогенетический анализ и анализ попарных эволюционных дистанций между последовательностями НА.

Для визуализации изменчивости структуры НА (на аминокислотном уровне) штаммов вируса гриппа В как генетической линии В/Victoria, так и В/Yamagata было построено филогенетическое дерево (рис. 26).

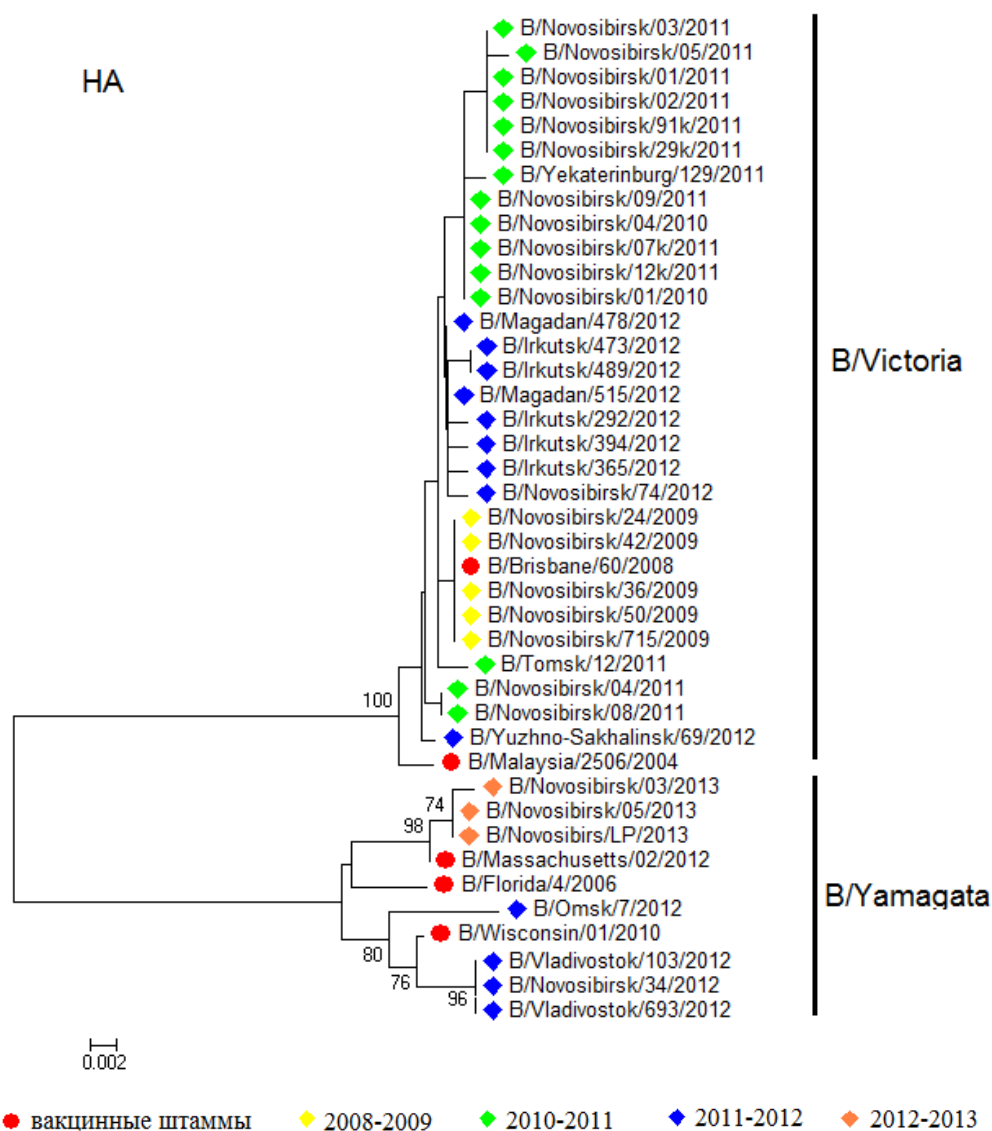


Рисунок 26. Дендрограмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей НА штаммов вируса гриппа В, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. и вакцинных штаммов соответствующих эпидемических сезонов (отмечены маркерами разных цветов).

Из структуры филогенетической дендрограммы следует, что все исследованные последовательности подразделяются на две основные генетические линии – В/Victoria и

V/Yamagata. Последовательности характеризуются низкой степенью гетерогенности, особенно в пределах отдельных эпидемических сезонов (вплоть до полной идентичности).

В целом, по первичной структуре HA исследованные штаммы близки к вакцинным штаммам соответствующих эпидемических сезонов, за исключением штаммов генетической линии V/Yamagata, изолированных в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг., когда вакцинным штаммом еще был V/Wisconsin/01/2010, но исследованные российские штаммы были схожи с V/Massachusetts/02/2012.

Из различий в длинах ветвей филогенетической дендрограммы следует, что в сравнении со штаммами линии V/Yamagata, штаммы генетической линии V/Victoria характеризуются меньшей изменчивостью первичной структуры белка HA.

Для комплексной оценки изменчивости штаммов различных сезонов относительно друг друга, а также относительно вакцинных штаммов, были построены матрицы попарных дистанций (на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей). Результаты представлены в виде «тепловых карт» (рис. 27).

Согласно «тепловой карте», построенной на основе нуклеотидных последовательностей HA, после пандемии вируса гриппа A(H1N1) pdm09 произошло увеличение эволюционных дистанций между сибирскими изолятами вирусов гриппа В генетической линии V/Victoria и предыдущим вакцинным штаммом V/Malaysia/2506/2004 и в дальнейшем увеличения (как и уменьшения) генетических дистанций не происходило. Штаммы вируса гриппа В накопили нуклеотидные замены, обусловившие значительные отличия от прежнего вакцинного штамма. На аминокислотном уровне эволюционные дистанции от штамма V/Malaysia/2506/2004 в среднем уменьшились в эпидемический сезона 2011-2012 гг., главным образом за счет изолятов, выделенных в Магадане.

В дальнейшем (на протяжении двух эпидемических сезонов) сегмент генома, кодирующий HA, при неизменной эволюционной дистанции относительно HA штамма V/Malaysia/2506/2004, изменялся относительно HA вакцинного штамма V/Brisbane/60/2008. Таким образом, динамику изменения эволюционных дистанций относительно V/Malaysia/2506/2004 можно охарактеризовать как увеличение с последующей стабилизацией. Иной паттерн изменчивости оказался характерен для генетических дистанций относительно штамма V/Brisbane/60/2008. Сразу после пандемии (эпидемический сезон 2010-2011 гг.) также как и в случае с вакцинным штаммом V/Malaysia/2506/2004 произошло увеличение эволюционных расстояний (более значительное), но для штаммов следующего эпидемического сезона не было обнаружено ни стагнации, ни роста дистанций.

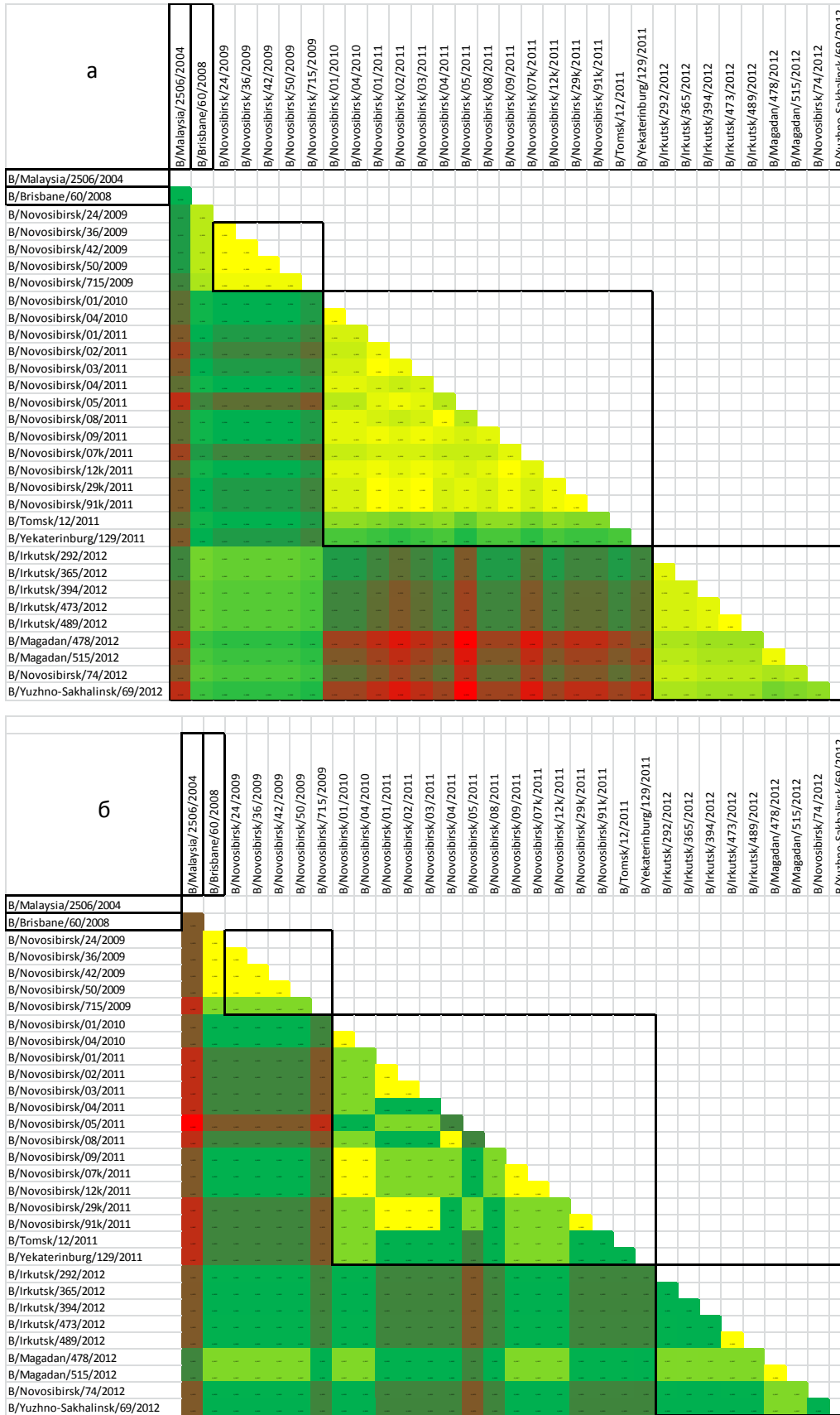


Рисунок 27. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria.

Штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. по первичной структуре гена HA оказались менее дистанцированы от вакцинного штамма, чем штаммы предыдущего эпидемического сезона. Схожие колебания значений эволюционных дистанций были характерны и для аминокислотных последовательностей HA российских штаммов.

При анализе дистанций между последовательностями HA штаммов разных эпидемических сезонов обнаружено, что штаммы, изолированные в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., по первичной структуре гена HA более дистанцированы от штаммов постпандемического сезона 2010-2011 гг. (среднее значение эволюционных дистанций составило  $0,0127 \pm 0,0010$ ) чем от штаммов предпандемического сезона 2008-2009 гг. ( $0,0076 \pm 0,0009$ ). Кроме того, эволюционные дистанции ( $0,0112 \pm 0,0006$ ) между штаммами, выделенными в предпандемический сезон 2008-2009 гг. и постпандемический сезон 2010-2011 гг. превышают расстояния между штаммами эпидемических сезонов 2008-2009 и 2011-2012 гг.. По первичной структуре белка HA штаммы постпандемического сезона 2010-2011 гг. также эволюционно дистанцированы от более схожих между собой штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 гг. (предпандемический) и 2011-2012 гг. Дистанции между штаммами сезонов 2008-2009 и 2011-2012 гг. составляют  $0,0034 \pm 0,0010$ , между штаммами сезонов 2008-2009 и 2010-2011 –  $0,0051 \pm 0,0012$  и между штаммами сезонов 2010-2011 и 2011-2012 –  $0,0044 \pm 0,0012$ .

В целом, на аминокислотном уровне, HA российских изолятов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria дистанцированы друг от друга на различные эволюционные расстояния, в том числе и в пределах отдельных эпидемических сезонов. Это обуславливает значительную величину стандартного отклонения среднего значения эволюционных дистанций. Т.е. в пределах отдельных эпидемических сезонов изолировались как штаммы схожие между собой по первичной структуре HA (до полной идентичности), так и штаммы, содержащие различное количество аминокислотных замен.

Т.к. в этой работе рассматриваются штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированные в течение двух последовательных эпидемических сезонов 2011-2012 и 2012-2013 гг., невозможно выявить корреляцию между характером их изменчивости и пандемией А(H1N1) pdm09. Исходя из «тепловых карт» (рис. 28), можно отметить большие, чем в случае с вирусами гриппа линии В/Victoria, значения эволюционных дистанций между HA российских изолятов эпидемического сезона 2012-2013 гг. и вакцинным штаммом предыдущего сезона. Кроме того, дистанции между штаммами последовательных эпидемических сезонов ( $0,0249 \pm 0,0008$  на нуклеотидном уровне и  $0,0199 \pm 0,0008$  на аминокислотном) также превышают аналогичные значения для вирусов линии В/Victoria.

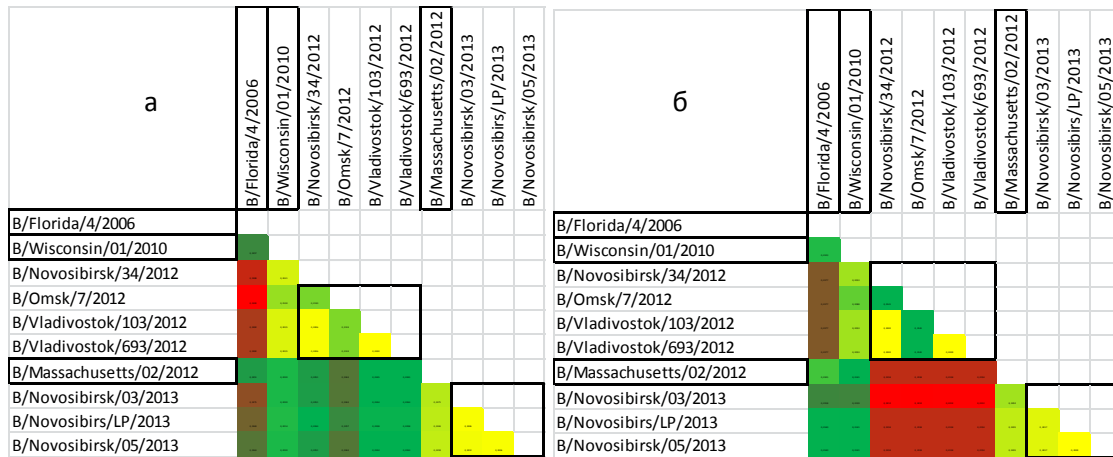


Рисунок 28. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata.

Метод филогенетических сетей наглядно показывает удаленность генетических линий В/Yamagata и В/Victoria и наличие нескольких кластеров генетически близких последовательностей.

Но филогенетическая сеть, построенная на основе всех последовательностей НА вируса гриппа В (рис. 29), неинформативна для визуализации связей между штаммами в пределах отдельных генетических линий, т.к. масштабирование в анализе осуществляется именно относительно различий между генетическими линиями. Для визуализации филогенетических связей между НА отдельных генетических линий были построены соответствующие филогенетические сети (рис. 30).

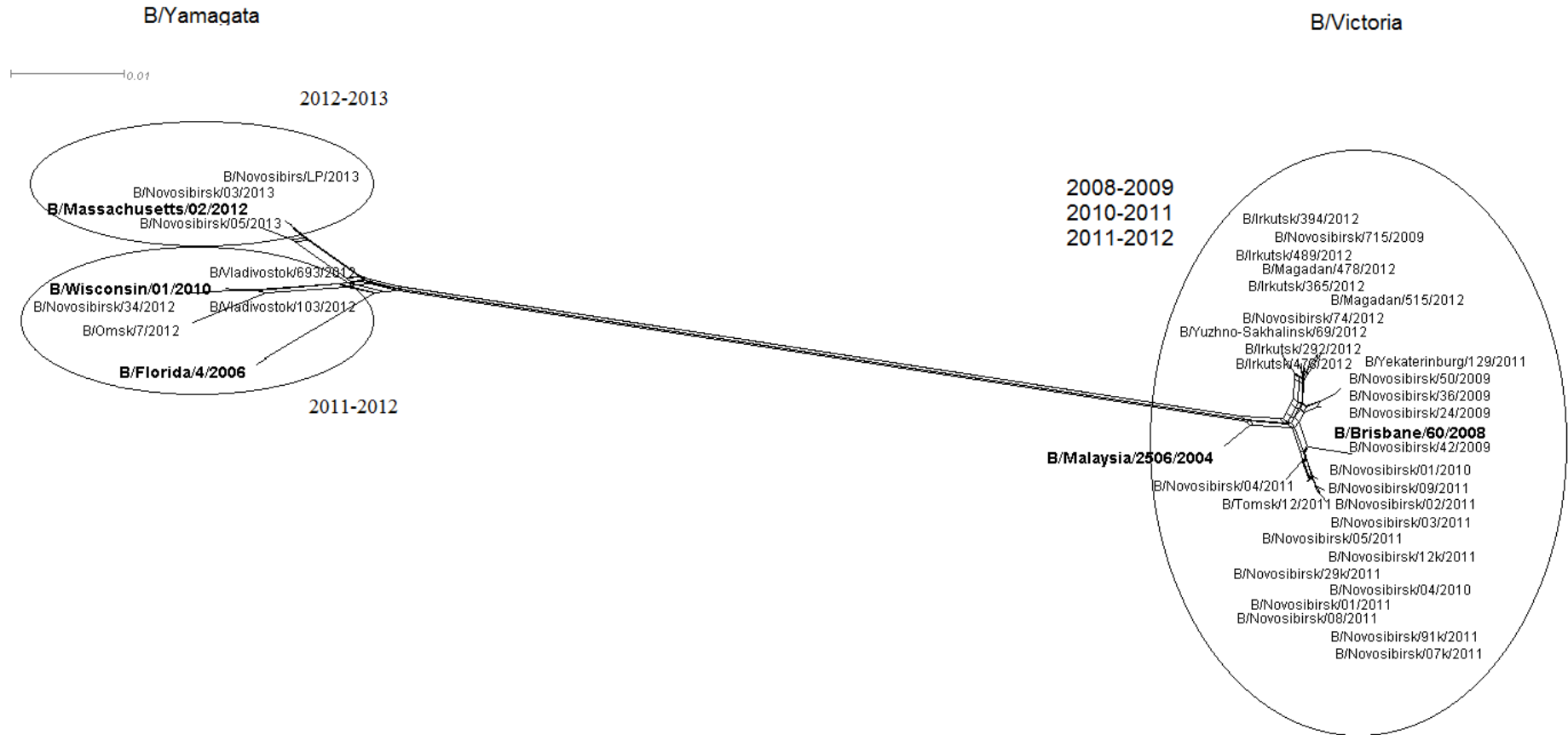


Рисунок 29. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих НА штаммов вируса гриппа В, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг., а также вакцинных штаммов.

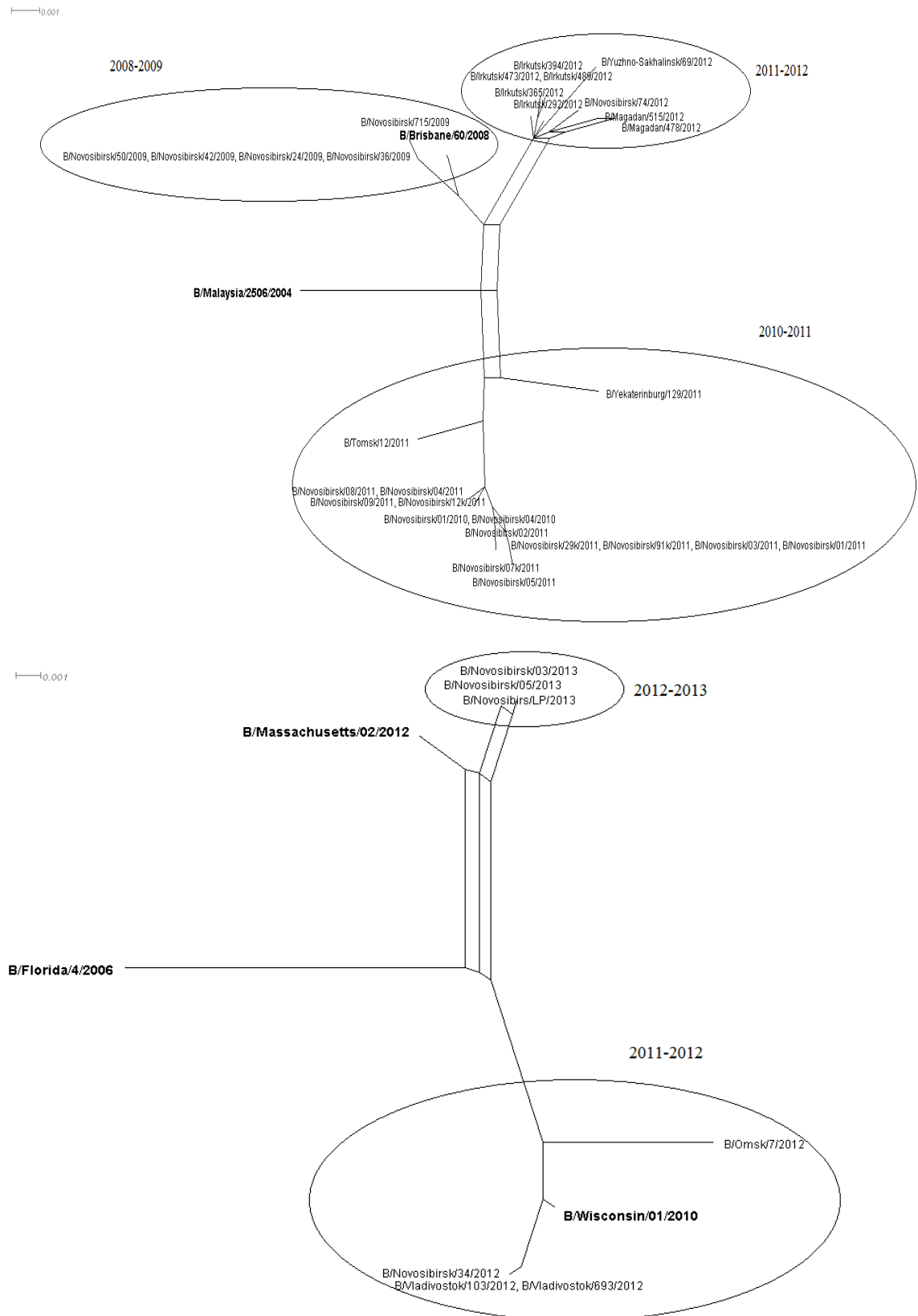


Рисунок 30. Филогенетические сети, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих HA штаммов вируса гриппа В генетических линий В/Victoria и В/Yamagata.

Кроме филогенетических сетей для визуализации эволюционных взаимосвязей между HA штаммов вируса гриппа типа В также были использованы более классические и широко

применяемые филогенетические дендрограммы (рис. 31-32). Для построения филогенетических дендрограмм были использованы нуклеотидные последовательности сегментов генома, кодирующих гемагглютинин и нейраминидазу вирусов гриппа В, изолированных на территории азиатской части РФ, а также вакцинных штаммов разных эпидемических сезонов и штаммов, изолированных на территории других стран (первичные структуры генов доступны в международной базе данных GenBank).

Штаммы сезона 2008-2009 гг. компактно сгруппированы (и, следовательно, близкородственны между собой) и филогенетически родственны вакцинному штамму В/Brisbane/60/2008. Кроме того, штаммы эпидемического сезона 2008-2009 филогенетически близки к штаммам вируса гриппа В, изолированным на территории США и Тайваня.

Штаммы эпидемического сезона 2010-2011, выделенные на территории азиатской части РФ, принадлежат генетической группе 1В линии Victoria. Большая часть штаммов (13 из 15) исключая В/Tomsk/12/2011 и В/Yekaterinburg/129/2011 образуют компактную филогенетическую группу и близкородственны штаммам, выделенным в Екатеринбурге (другим коллективом исследователей), Тайване, Китае и Тайланде. Штамм В/Tomsk/12/2011 филогенетически близок к штаммам, выделенным на территории Украины и Молдовы. Штамм В/Yekaterinburg/129/2011 близкородственен штаммам изолированным на территории РФ, Европы и Юго-Восточной Азии.

Штаммы сезона 2011-2012 гг. подобно штаммам сезона 2008-2009 гг. принадлежат к генетической группе 1А. Эти штаммы не образуют компактной филогенетической группы, а подразделяются на несколько подгрупп в пределах одной ветви филогенетического дерева.



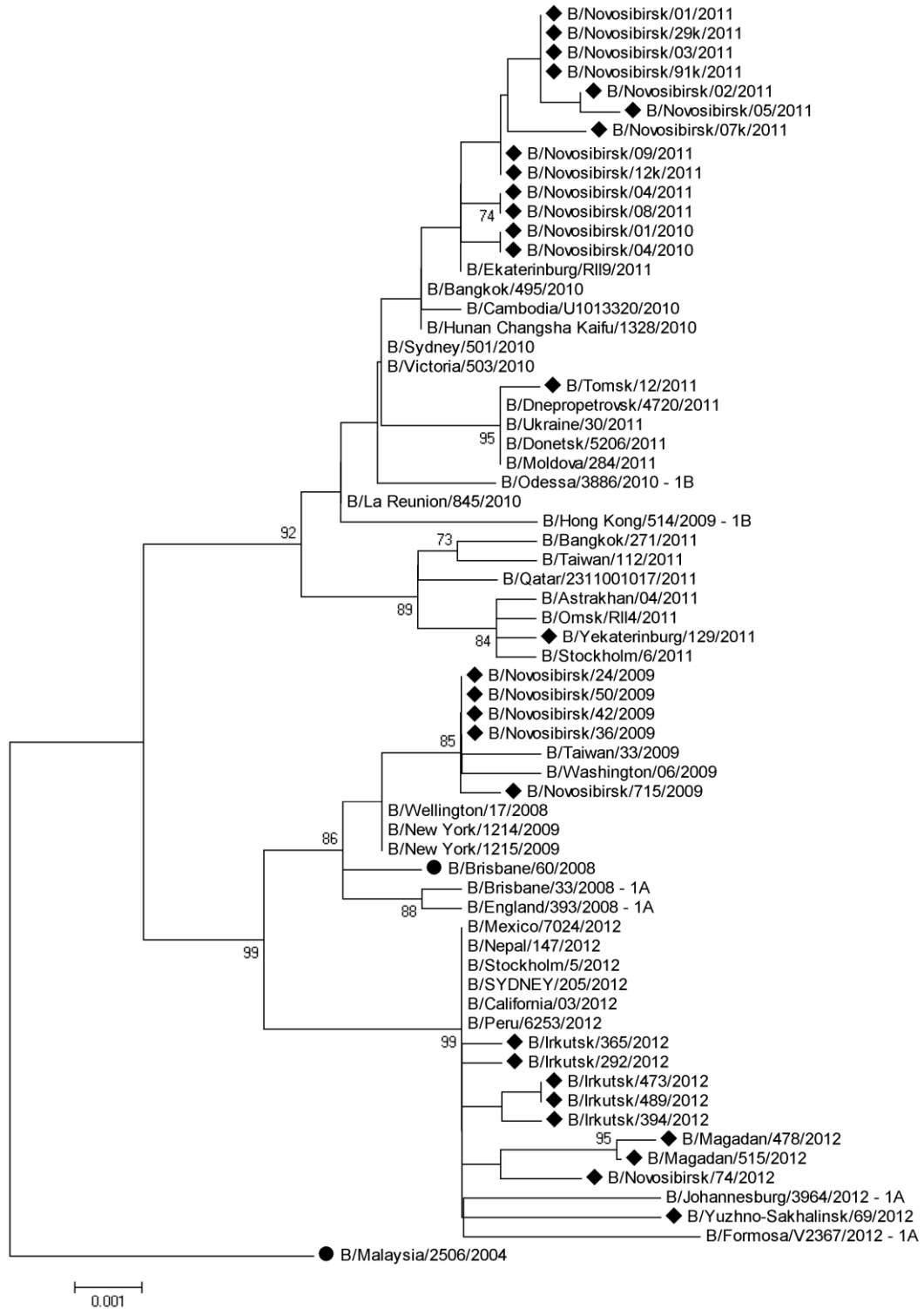


Рисунок 31. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria. Круглые маркеры – вакцинные штаммы. Ромбовидные маркеры – исследованные штаммы.

Штаммы линии В/Yamagata принадлежат к генетической кладе вакцинного штамма В/Wisconsin/01/2010 (клада 3) и локализованы на двух ветвях филогенетической дендрограммы (рис. 27). Штаммы В/Vladivostok/693/2012, В/Vladivostok/103/2012 и В/Novosibirsk/34/2012 образуют группу филогенетически схожих штаммов. Штамм В/Omsk/7/2012 филогенетически отличен от других исследованных штаммов эпидемического сезона. Штаммы, выделенные в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг. относятся к кладе 2, наряду с вакцинным штаммом В/Massachusetts/02/2012.

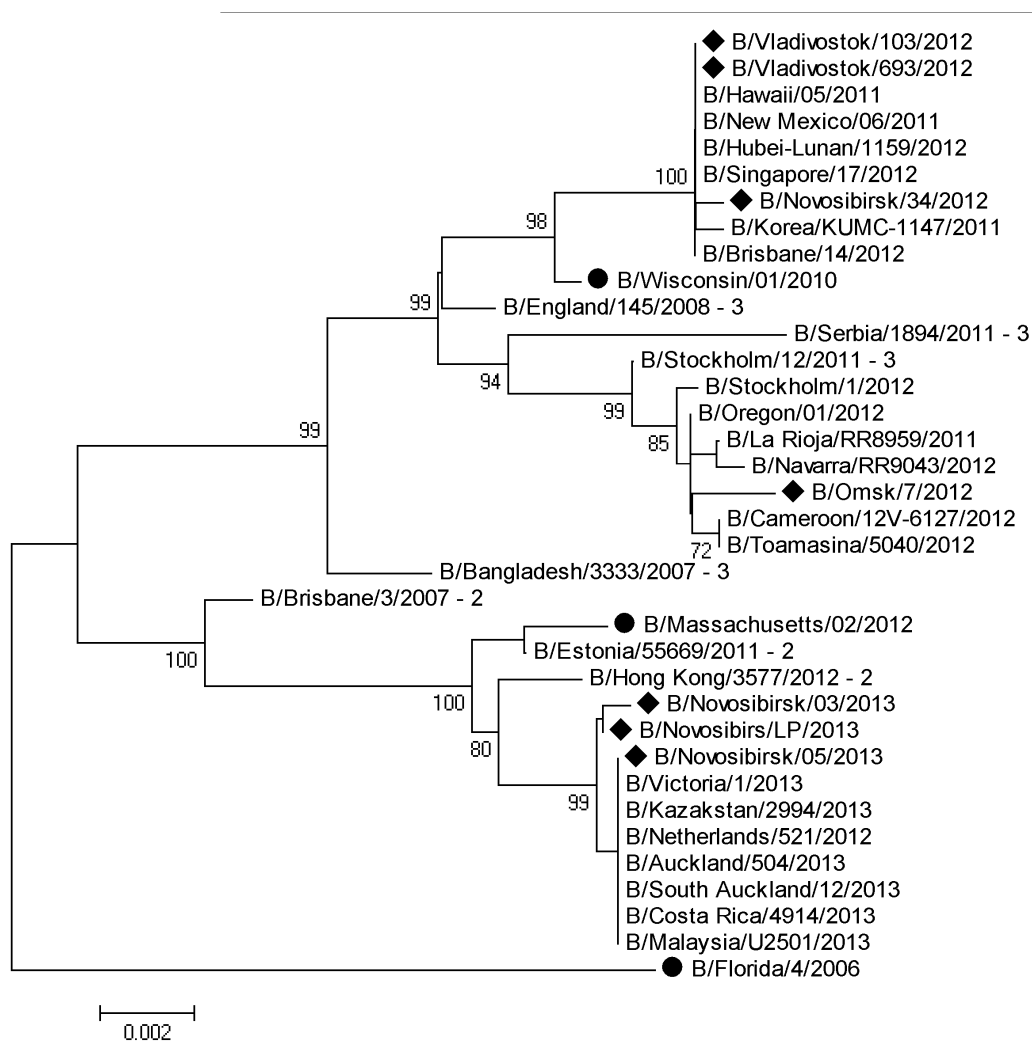


Рисунок 32. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata. Круглые маркеры – вакцинные штаммы. Ромбовидные маркеры – исследованные штаммы.

### Антигенный анализ штаммов вируса гриппа В

Анализ антигенных свойств штаммов вируса гриппа В представлен в таблице 44.

Таблица 44. Антигенные свойства штаммов вируса гриппа В (РТГА с хорьковыми референс-сыворотками и эритроцитами петуха). Серым цветом выделены штаммы генетической линии В/Yamagata.

		B/Malaysia/2506/2004	B/Brisbane/60/2008	B/Florida/04/2006	B/Wisconsin/01/2010	B/Massachusetts/02/2012
Вакцинные штаммы	B/Malaysia/2506/2004	<b>320</b>	640	-	-	-
	B/Brisbane/60/2008	320	<b>640</b>	-	-	-
	B/Florida/04/2006	-	-	<b>320</b>	80	320
	B/Wisconsin/01/2010	-	-	160	<b>320</b>	320
	B/Massachusetts/02/2012	-	-	640	320	<b>640</b>
2008-2009	B/Novosibirsk/24/2009	40	640	-	-	-
	B/Novosibirsk/36/2009	80	320	-	-	-
	B/Novosibirsk/42/2009	40	320	-	-	-
	B/Novosibirsk/50/2009	40	640	-	-	-
	B/Novosibirsk/715/2009	80	640	-	-	-
2010-2011	B/Novosibirsk/01/2010	40	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/04/2010	80	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/01/2011	40	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/02/2011	40	320	-	-	-
	B/Novosibirsk/03/2011	40	80	-	-	-
	B/Novosibirsk/04/2011	40	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/05/2011	80	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/08/2011	40	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/09/2011	80	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/07k/2011	20	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/12k/2011	40	320	-	-	-
	B/Novosibirsk/29k/2011	40	160	-	-	-
	B/Novosibirsk/91k/2011	20	80	-	-	-
	B/Tomsk/12/2011	40	160	-	-	-
B/Yekaterinburg/129/2011	20	80	-	-	-	
2011-2012	B/Irkutsk/292/2012	160	320	-	-	-
	B/Irkutsk/365/2012	160	320	-	-	-
	B/Irkutsk/394/2012	80	160	-	-	-
	B/Irkutsk/473/2012	160	320	-	-	-

	B/Irkutsk/489/2012	160	320	-	-	-
	B/Magadan/478/2012	40	80	-	-	-
	B/Magadan/515/2012	40	80	-	-	-
	B/Novosibirsk/74/2012	40	80	-	-	-
	B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012	160	320	-	-	-
2011-2012	B/Novosibirsk/34/2012	-	-	80	640	320
	B/Omsk/7/2012	-	-	80	320	640
	B/Vladivostok/103/2012	-	-	80	640	320
	B/Vladivostok/693/2012	-	-	80	640	320
2012-2013	B/Novosibirsk/03/2013	-	-	160	160	640
	B/Novosibirsk/05/2013	-	-	320	160	640
	B/Novosibirsk/LP/2013	-	-	160	160	640

Как видно из таблицы, все проанализированные штаммы вируса гриппа В, выделенные в Новосибирской области в эпидемические сезоны 2008-2009 и 2010-2011 гг., относятся к линии Victoria, большинство штаммов проявляют кросс-реактивность с сывороткой к вакцинному штамму В/Brisbane/60/2008 (некоторые со снижением титра в РТГА в 2-4 раза), однако у двух штаммов (В/Novosibirsk/91k/2011 и В/Novosibirsk/03/2011) наблюдалось уменьшение сродства с сывороткой в 8 раз по сравнению с гомологичным штаммом. Также для большинства штаммов было значительное уменьшение (до 8 раз), а для трех штаммов (В/Novosibirsk/07k/2011, В/Novosibirsk/91k/2011, В/Yekaterinburg/129/2011) – отсутствие перекрестной реактивности в РТГА с сывороткой к В/Malaysia/2506/2004.

В течение эпидемического сезона 2011-2012 гг. выделялись штаммы по своим антигенным характеристикам относящиеся к обеим генетическим линиям вируса гриппа В. Штаммы генетической линии В/Victoria, за исключением изолированных в Магадане и Новосибирске, проявляли сродство к сыворотке против вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008. При этом возросла кросс-реактивность (до ½ гомологичного титра) в РТГА с сывороткой к предыдущему вакцинному штамму В/Malaysia/2506/2004. Штаммы генетической линии В/Yamagata характеризовались сниженным сродством к сыворотке против штамма В/Florida/04/2006 и выраженной кросс-реактивностью в РТГА с сыворотками к штаммам В/Wisconsin/01/2010 (вакцинный штамм, актуальный на 2011-2012 эпидемический сезон) и В/Massachusetts/02/2012.

В эпидемический сезон 2012-2013 гг. были выделены только штаммы генетической линии В/Yamagata, для которых было характерно незначительное повышение кросс-реактивности с сывороткой к В/Florida/04/2006, снижение (по сравнению со штаммами предыдущего сезона) сродства к В/Wisconsin/01/2010 и высокая кросс-реактивность с сывороткой к В/Massachusetts/02/2012.

Полученные данные свидетельствуют об антигеном дрейфе вируса гриппа В, проявляющемся колебанием кросс-реактивности с сывороткой к вакцинным штаммам вследствие отклонения от существующего иммунного пресса со стороны популяции.

### Изменчивость первичной структуры белка NA

#### Генетическая линия В/Victoria

За три эпидемических сезона обнаружено 15 позиций, в которых происходили аминокислотные замены (табл. 45) относительно вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. из анализа исключены спорадические замены).

Таблица 45. Позиции в NA, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинных штаммов, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов. Синим и желтым цветами выделены замены, расположенные в антигенных сайтах. Светло-серый цвет - замены, обнаруживаемые в течении двух эпидемических сезонов.

Антигенный сайт											3	4				
	27	36	38	51	73	75	76	199	295	329	340	358	378	395	463	
<b>В/Brisbane/60/2008</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	
В/Novosibirsk/24/2009													E		N	
В/Novosibirsk/36/2009													E		N	
В/Novosibirsk/42/2009													E		N	
В/Novosibirsk/50/2009													E		N	
В/Novosibirsk/715/2009													E		N	
В/Novosibirsk/01/2010	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/04/2010	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/01/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/02/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/03/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/04/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/05/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/08/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/09/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/07k/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/12k/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/29k/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Novosibirsk/91k/2011	L		P	S	F		S	D		D						
В/Tomsk/12/2011	L			S	F			D		D						
В/Yekaterinburg/129/2011					F					D					T	
В/Irkutsk/292/2012		M						K	R		D	K			T	
В/Irkutsk/365/2012		M						K	R		D	K			T	
В/Irkutsk/394/2012									R		D	K			T	
В/Irkutsk/473/2012						P			R		D	K			T	
В/Irkutsk/489/2012						P			R		D	K			T	
В/Magadan/478/2012									R		D	K				
В/Magadan/515/2012									R		D	K				
В/Novosibirsk/74/2012									R		D	K				
В/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012									R		D	K				

Выявлено большее количество (по сравнению с НА) аминокислотных замен между последовательностями НА штаммов выделенных в разные эпидемические сезоны. Т.е. по структуре НА штаммы различных сезонов значительно отличаются и несмотря на то, что нейраминидаза – не основной антиген вируса гриппа, именно для этого поверхностного гликопротеина выявлена значительная изменчивость при смене эпидемических сезонов.

Кроме того, у аминокислотной последовательности НА обнаружены позиции, в которых в разные эпидемические сезоны обнаруживаются разные типичные для сезона аминокислоты: в положении 27 – S-L-S, 38 – L-P-L, 51 – P-S-P, 73 – L-F-L, 76 – P-S-P, 329 – N-D-N, 395 – A-T-A и в положении 199 в разные сезоны обнаружены аминокислоты N-D-N-K-N.

Примечательно, что штаммы, изолированные в эпидемические сезоны 2008-2009 и 2011-2012 гг. между собой отличаются меньшим количеством, встречающихся в двух и более штаммах, аминокислотных замен, чем при сравнении со штаммами эпидемического сезона 2010-2011 гг.

Пространственная локализация аминокислотных замен, обнаруженных хотя бы в двух последовательностях НА, приведена на рисунке 33.

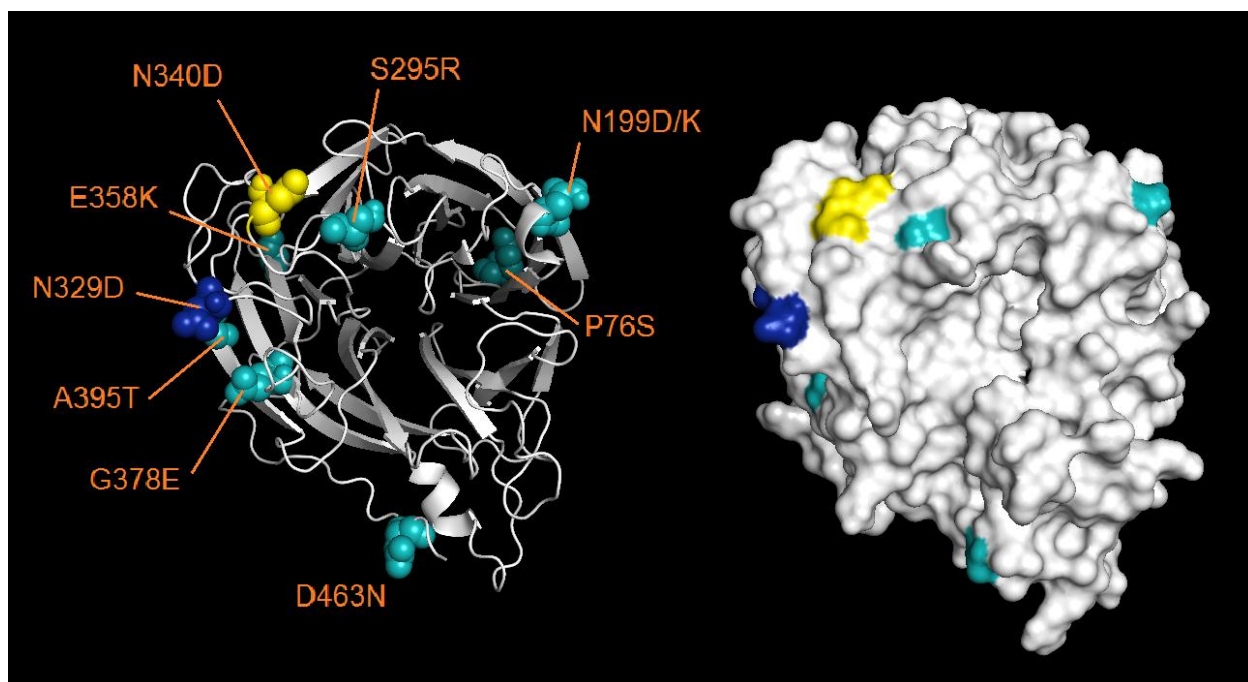


Рисунок 33. Аминокислотные замены в НА штаммов вируса гриппа В генетической линии Victoria, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. Различные цвета указывают на принадлежность мутаций к отдельным антигенным сайтам: синий – 3, желтый – 4, голубой – позиция аминокислотной замены не относится к антигенным сайтам.

*Генетическая линия В/Yamagata*

За два эпидемических сезона обнаружено 11 позиций в нейраминидазе, в которых происходили аминокислотные замены (табл. 46), при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. исключены спорадические замены).

Таблица 46. Позиции в NA, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинных штаммов, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов. Желтый цвет – антигенный сайт.

Антигенный сайт									4		
	36	42	68	106	125	186	248	295	340	463	465
<b>B/Wisconsin/01/2010</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>T</b>
B/Novosibirsk/34/2012											
B/Omsk/7/2012											
B/Vladivostok/103/2012	M										
B/Vladivostok/693/2012	M										
<b>B/Massachusetts/02/2012</b>		<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>A</b>
B/Novosibirsk/03/2013		Q	A	I	T	K	V	R	D	D	A
B/Novosibirsk/05/2013		Q	A	I	T	K	V	R	D	D	A
B/Novosibirsk/LP/2013		Q	A	I	T	K	V	R	D	D	A

Из 11 позиций аминокислотных замен - 7 характерны для всех штаммов эпидемического сезона 2011-2012 гг., отличают их от вакцинного штамма B/Florida/4/2006 и являются общими с вакцинным штаммом B/Wisconsin/01/2010. А замена I36M обнаружена только в штаммах, изолированных во Владивостоке и отличает их от штамма B/Wisconsin/01/2010. Замены, обнаруженные в штаммах эпидемического сезона 2011-2012 гг. в дальнейшем не выявлены в штаммах сезона 2012-2013 гг. Для изолятов этого сезона характерны три новых аминокислотных замены, ранее обнаруженных в штамме B/Massachusetts/02/2012, который в дальнейшем был включен в состав вакцины. Таким образом, штаммы двух последовательных эпидемических сезонов отличаются по всем 12 положениям аминокислотных замен, зафиксированных в вирусной популяции.

В аминокислотных последовательностях NA всех исследованных штаммов вируса гриппа В генетических линий B/Victoria и B/Yamagata не было обнаружено специфических замен (E119A, E119A/D, E119G, E119V, R152K, D198E, D198N, D198Y, I222T, I222V/I, N274Y, R292K, N294S, R371K, G402S), обуславливающих снижение чувствительности к действию этиотропных химиопрепаратов – ингибиторов нейраминидазы. Этот результат теоретического анализа последовательностей подтвержден экспериментально при оценке активности нейраминидазы и ее ингибирования специфическими препаратами. Для изучения активности нейраминидазы и степени ее ингибирования под воздействием озельтамивира и занамивира

использовался флуоресцентно-меченный субстрат нейраминидазы MUNANA и контрольный мутантный штамм, обладающий сниженной чувствительностью к ингибиторам нейраминидазы.

На 3D-модели (рис. 34) отображены аминокислотные замены в NA штаммов двух последовательных эпидемических сезонов.

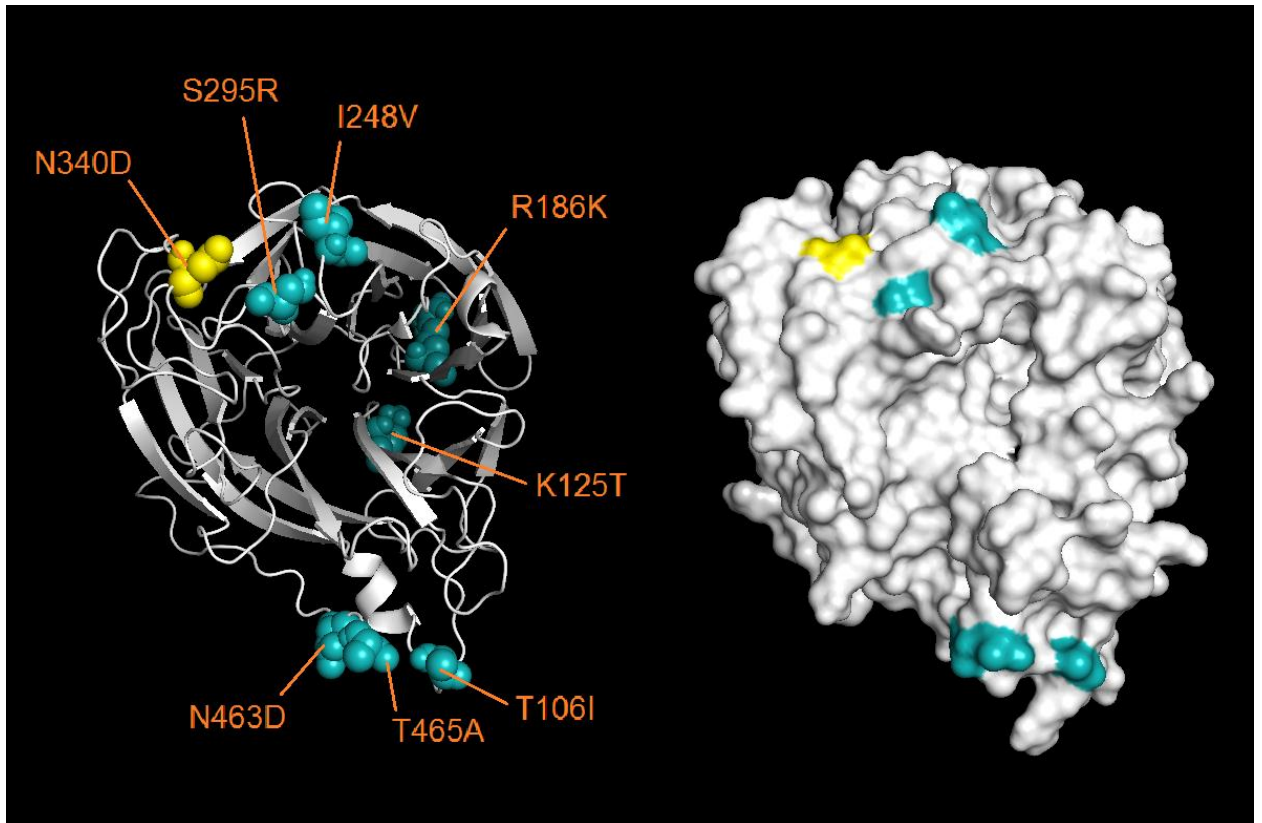


Рисунок 34. Аминокислотные замены в NA штаммов вируса гриппа В генетической линии Yamagata, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. Различные цвета указывают на принадлежность мутаций к отдельным антигенным сайтам: желтый – 4, голубой – позиция аминокислотной замены не относится к антигенным сайтам.

#### **Филогенетический анализ и анализ попарных эволюционных дистанций между последовательностями NA.**

Для визуализации изменчивости структуры нейраминидазы на аминокислотном уровне была построена филогенетическая дендрограмма (рис. 35).

Из структуры филогенетического дерева видно, что исследованные последовательности на аминокислотном уровне подразделяются на две основные генетические линии – В/Victoria и В/Yamagata.

Пул последовательностей NA характеризуется более высокой, чем HA, степенью гетерогенности: штаммы отдельных сезонов образуют отдельные филогенетические группы, внутри которых происходит дальнейшая дифференциация последовательностей. Исключение



составляют штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг., большая часть которых (13 из 15) характеризуются идентичностью первичной структуры белка NA.

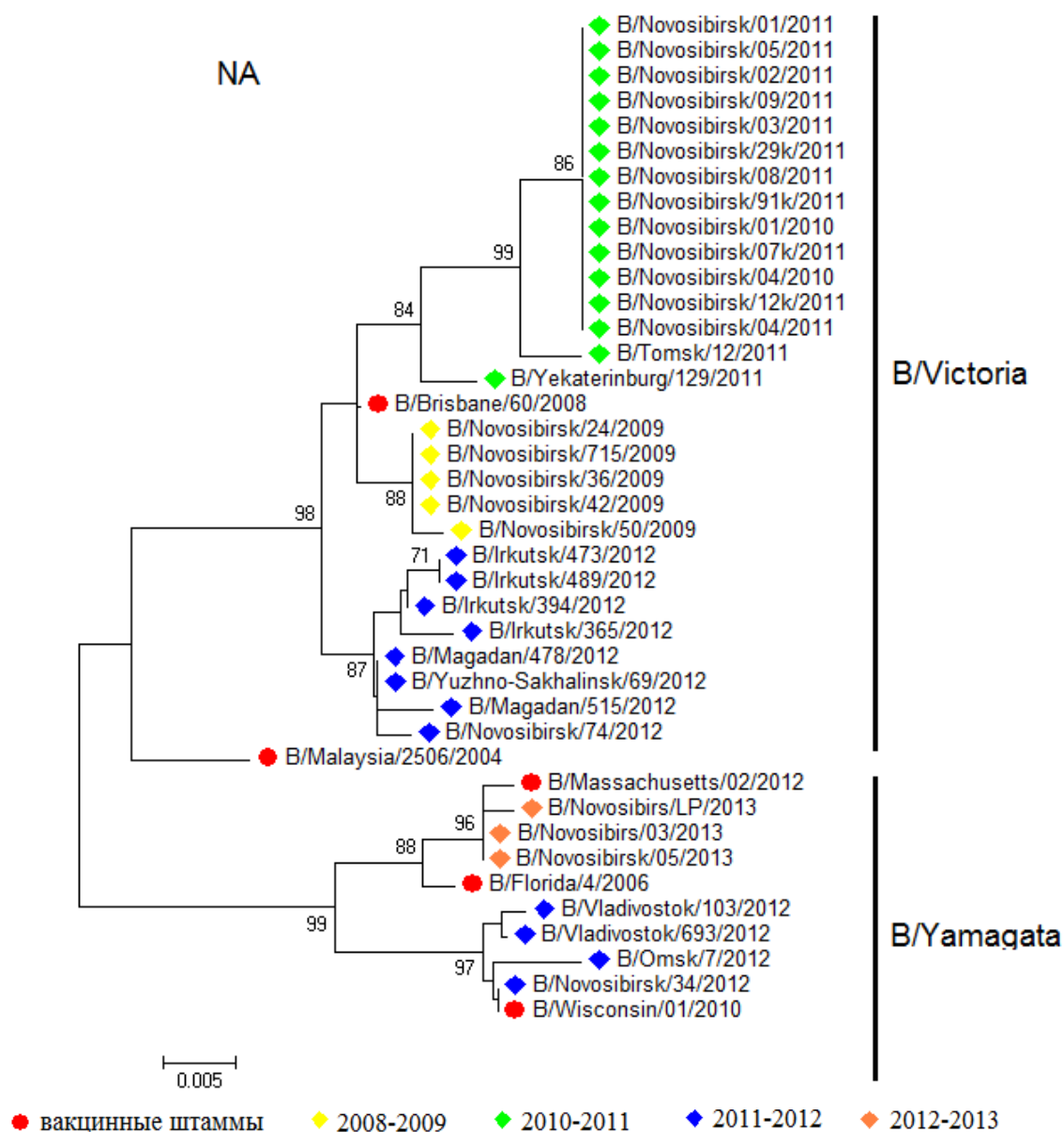


Рисунок 35. Дендрограмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей NA штаммов вируса гриппа В, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. и вакцинных штаммов соответствующих эпидемических сезонов (отмечены маркерами разных цветов).

В целом, по первичной структуре NA, исследованные штаммы генетической линии В/Yamagata близки к вакцинным штаммам соответствующих эпидемических сезонов, за исключением штаммов генетической линии В/Yamagata, изолированных в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг., когда вакцинным штаммом еще был В/Wisconsin/01/2010, но исследованные российские штаммы были схожи с В/Massachusetts/02/2012. Штаммы

генетической линии В/Victoria являются дрейфовыми вариантами относительно вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008.

Для общего анализа изменчивости штаммов различных сезонов относительно друг друга, а также относительно вакцинных штаммов, были построены матрицы попарных дистанций. Результаты представлены в виде «тепловых карт» (рис. 36).

После пандемии вируса гриппа А/Н1N1pdm09 произошло увеличение эволюционных дистанций (как на нуклеотидном уровне, так и на аминокислотном) между NA российских штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria и NA соответствующих вакцинных штаммов. При этом, эволюционные расстояния между нуклеотидными последовательностями на протяжении двух последовательных эпидемических сезонов (2010-2011 и 2011-2012 гг.) менялись незначительно. А на аминокислотном уровне произошло уменьшение попарных эволюционных дистанций между российскими изолятами и вакцинными штаммами.

Согласно матрицам эволюционных дистанций штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. по структуре NA в большей мере схожи не со штаммами предыдущего сезона 2010-2011 гг., а со штаммами, изолированными в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг. (до пандемии А/Н1N1pdm09). Эволюционные дистанции в среднем составляют:

- между последовательностями NA штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 и 2010-2011 гг. –  $0,0101 \pm 0,0006$  на нуклеотидном уровне и  $0,0197 \pm 0,0019$  – на аминокислотном;
- между последовательностями NA штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 и 2011-2012 гг. –  $0,0082 \pm 0,0009$  на нуклеотидном уровне и  $0,0148 \pm 0,0025$  – на аминокислотном;
- между последовательностями NA штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг. –  $0,0137 \pm 0,0012$  на нуклеотидном уровне и  $0,0244 \pm 0,0028$  – на аминокислотном.

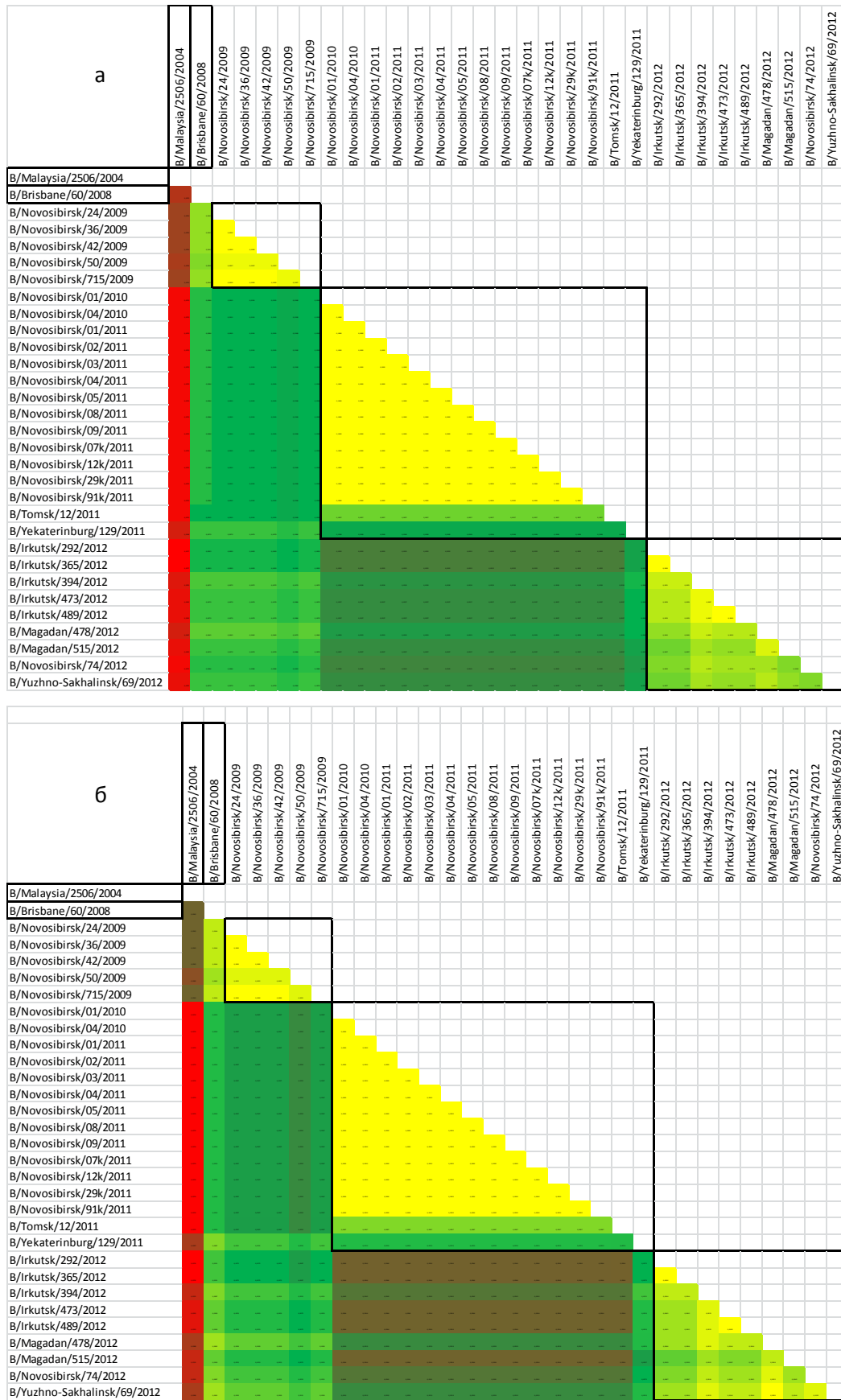


Рисунок 36. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria.

Российские штаммы вируса гриппа В линии В/Yamagata, изолированные в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., по первичной структуре NA схожи с вакцинным штаммом В/Wisconsin/01/2010 и дистанцированы от предыдущего вакцинного штамма В/Florida/4/2006. Штаммы следующего эпидемического сезона 2012-2013 гг. схожи со штаммом В/Massachusetts/02/2012 и значительно дистанцированы от штамма В/Wisconsin/01/2010. При этом NA вирусов, изолированных в 2012-2013 гг. характеризуется уменьшением эволюционных дистанций от вакцинного штамма В/Florida/4/2006. Эволюционные расстояния между штаммами двух последовательных эпидемических сезонов максимальны и превышают дистанции между исследованными изолятами и вакцинными штаммами разных сезонов. Т.е. штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированные в азиатской части РФ в течение последовательных эпидемических сезонов 2011-2012 и 2012-2013 гг., по структуре NA принадлежат к двум различным генетическим группам и штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. не являются результатом эволюции вирусов гриппа, циркулировавших в 2011-2012 гг. (рис. 37.).

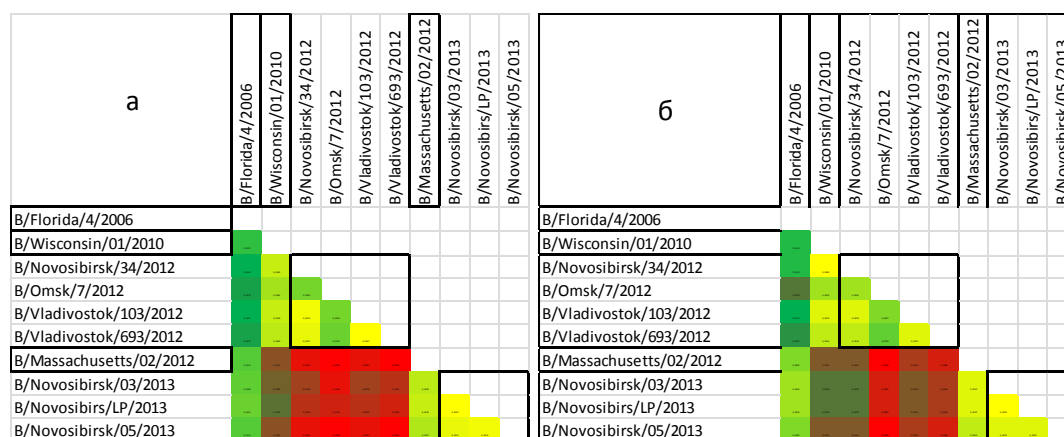


Рисунок 37. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata.

Метод филогенетических сетей наглядно демонстрирует удаленность генетических линий В/Yamagata и В/Victoria и формирование нескольких кластеров генетически близких последовательностей. Но филогенетическая сеть, построенная на основе всей совокупности последовательностей NA вирусов гриппа В (рис. 38) неинформативна в плане связей между штаммами в пределах отдельных генетических линий (В/Yamagata и В/Victoria), т.к. масштабирование в анализе осуществляется на основе различий между генетическими линиями, которые максимальны. Для визуализации филогенетических связей между NA отдельных генетических линий были построены соответствующие филогенетические сети (рис. 39-40).

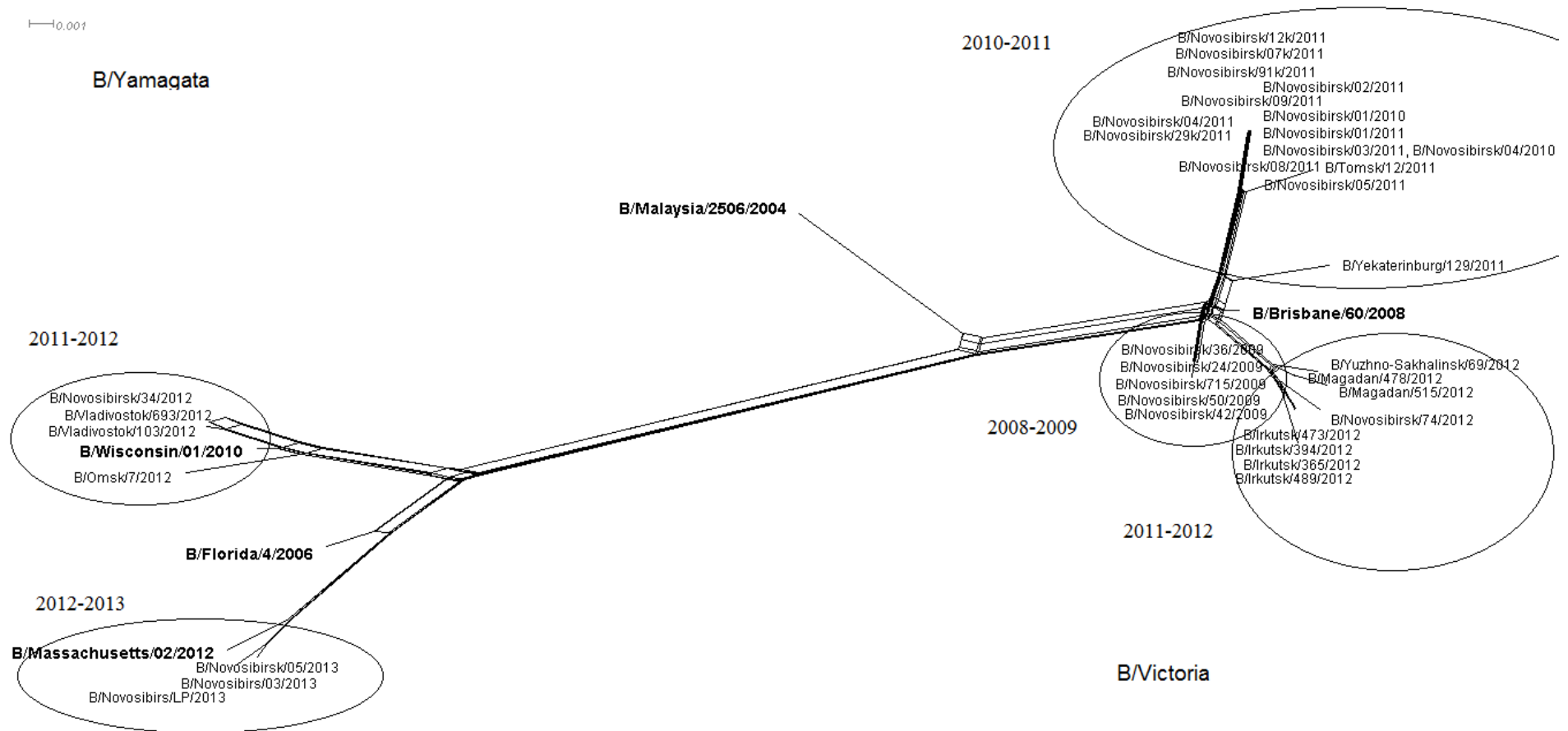


Рисунок 38. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа В, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг., а также вакцинных штаммов.

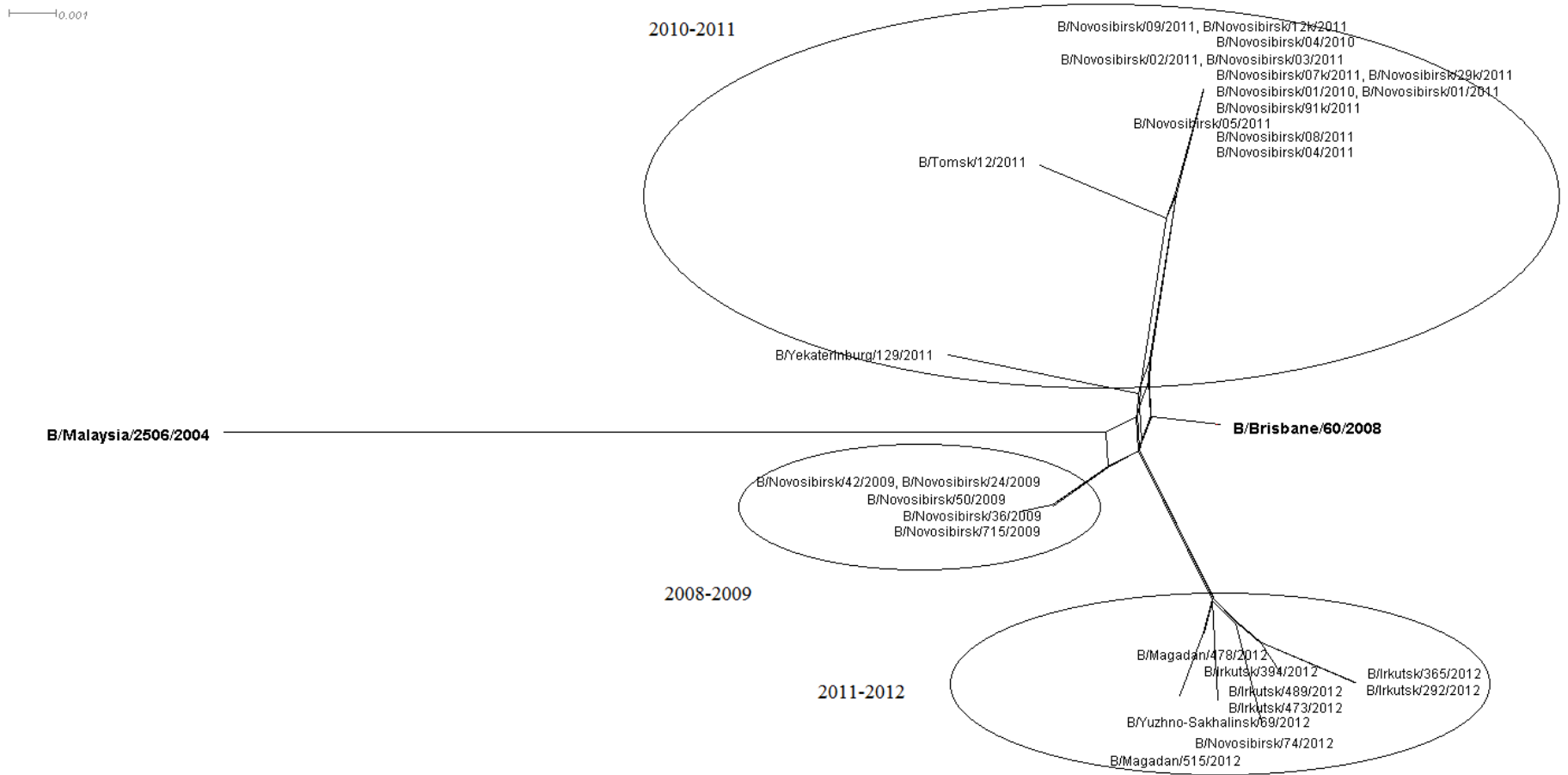


Рисунок 39. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг., а также вакцинных штаммов.

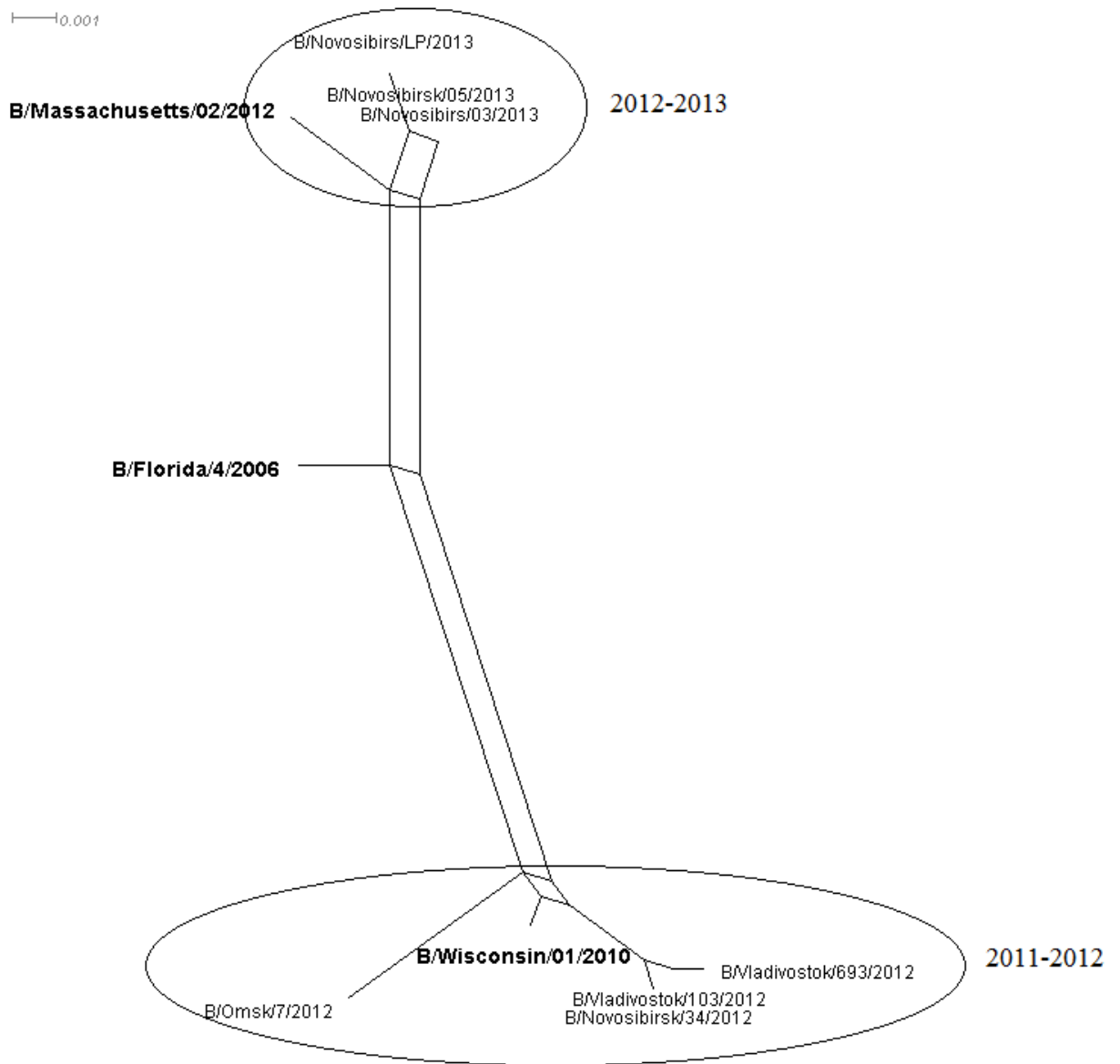


Рисунок 40. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированных в азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг., а также вакцинных штаммов.

Согласно филогенетической дендрограмме, построенной на основе нуклеотидных последовательностей NA (рис. 41), штаммы сезона 2008-2009 компактно сгруппированы (и, следовательно, близкородственны между собой) и родственны штаммам вируса гриппа В, изолированным на территории Украины и США.

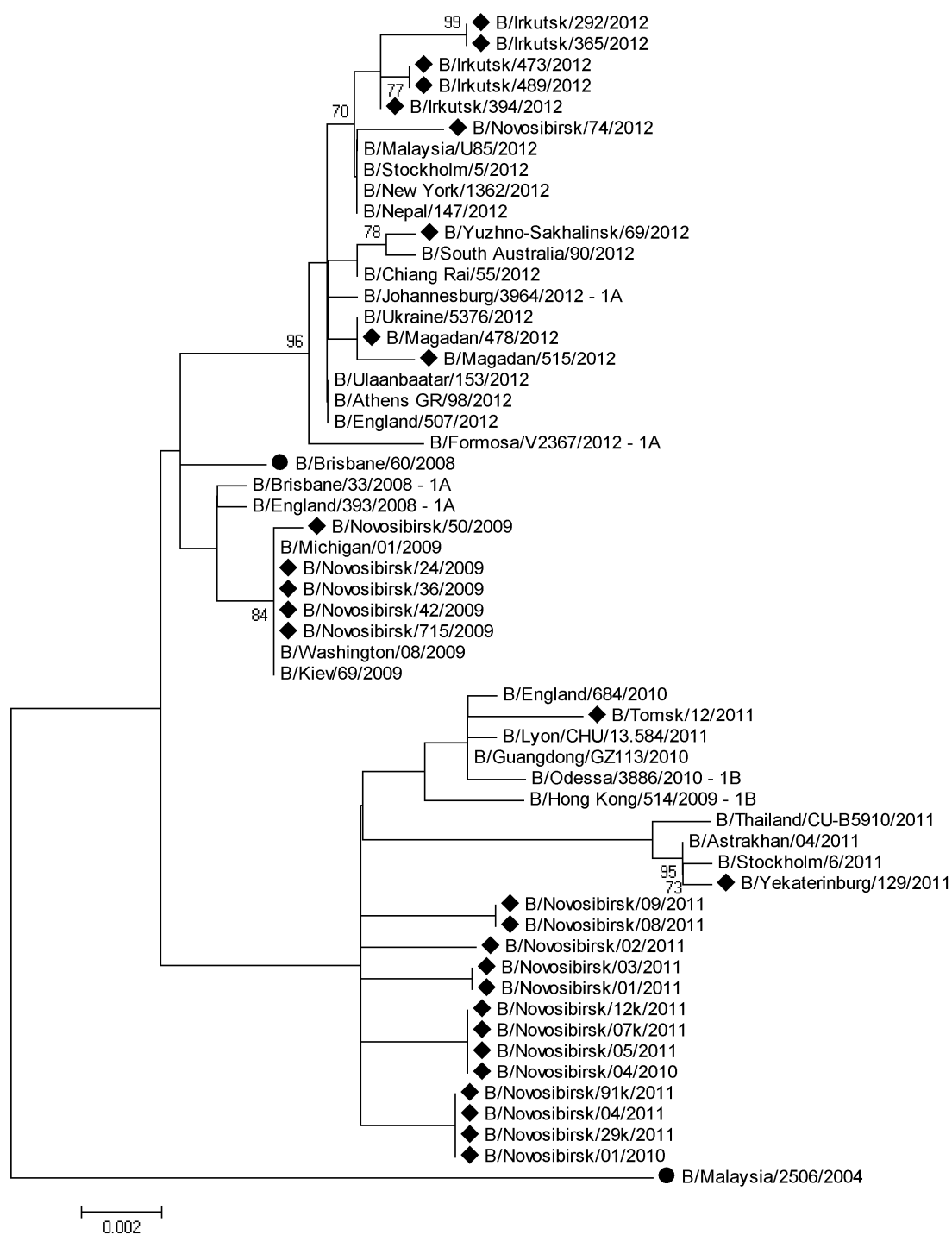


Рисунок 41. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria. Круглые маркеры – вакцинные штаммы. Ромбовидные маркеры – исследованные штаммы.

Штаммы эпидемического сезона 2010-2011 принадлежат к генетической группе 1В клады В/Brisbane/60/2008 линии В/Victoria. Большая часть штаммов (13 из 15) исключая В/Tomsk/12/2011 и В/Yekaterinburg/129/2011 образуют несколько близкородственных филогенетических групп. Штаммы В/Tomsk/12/2011 и В/Yekaterinburg/129/2011



филогенетически отличны от других штаммов сезона и близкородственны штаммам изолированным на территории Евразии.

Штаммы сезона 2011-2012 подобно штаммам сезона 2008-2009 принадлежат генетической группе 1А. Эти штаммы не образуют компактной филогенетической группы, а подразделяются на несколько подгрупп в пределах одной ветви филогенетического дерева.

Штаммы линии В/Yamagata эпидемического сезона 2011-2012 гг. принадлежали к кладе 3 (штаммы, подобные вакцинному В/Wisconsin/01/2010). Последовательности NA этих штаммов локализованы на двух ветвях филогенетического дерева (рис 42).

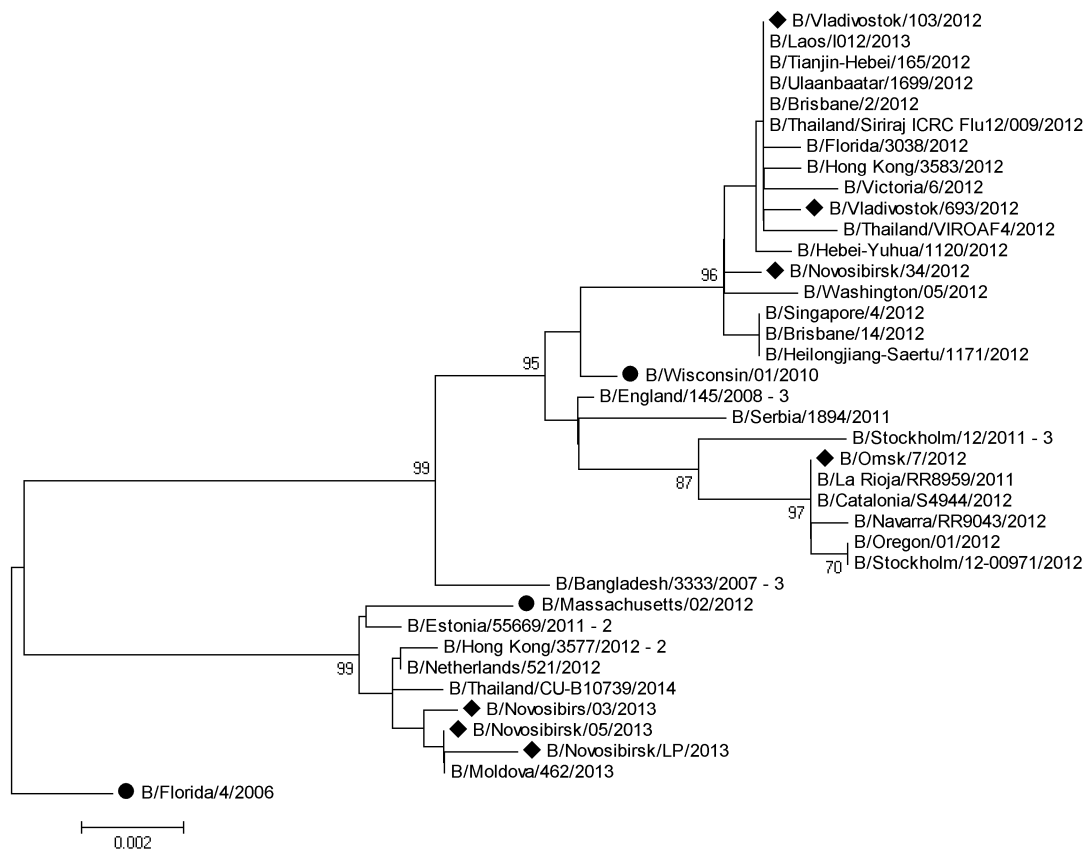


Рисунок 42. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata. Круглые маркеры – вакцинные штаммы. Ромбовидные маркеры – исследованные штаммы.

Штаммы В/Vladivostok/693/2012, В/Vladivostok/103/2012 и В/Novosibirsk/34/2012 образуют компактную группу филогенетически схожих штаммов, схожих со штаммами, изолированными в странах Азии (Китай, Тайланд, Лаос) и в США. Штамм В/Omsk/7/2012 филогенетически отличен от других исследованных штаммов и схож со штаммами, выделенными в Европе. Штаммы эпидемического сезона 2012-2013 гг. относятся к филогенетической группе вакцинного штамма В/Massachusetts/02/2012.

Результат филогенетического анализа совпадает с выводами, сделанными на основе анализа паттерна аминокислотных замен, наличия ключевых замен, а также на основе анализа идентичности циркулировавших штаммов вакцинным штамма разных сезонов.

## **ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Обсуждение результатов**

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в **эпидемический сезон 2008-2009** гг. в мире, в зависимости от географического региона, преобладали различные варианты вируса гриппа. В частности, в Японии преимущественно выделялся вирус гриппа А(Н3N2), в США и в странах Азии (н-р: в Корее) – А(Н1N1), в Канаде – вирус гриппа В. Согласно результатом нашего исследования – на рассматриваемой территории (азиатская часть РФ) выявлена коциркуляция вирусов гриппа А(Н3N2), А(Н1N1) (сезонный предпандемический вариант) и В. Вирусы гриппа А(Н3N2) и В, среди всех выделенных изолятов, составляли по 19%, т.е. в эпидемический сезон 2008-2009 гг. преобладающей формой вируса гриппа был А(Н1N1).

Согласно исследованиям, проведённым в Германии (Wedde, 2015) – штаммы вируса гриппа А(Н3N2), изолированные зимой 2008-2009 гг. в большинстве своем содержали ключевую аминокислотную замену К173Q в НА и принадлежали к генетической кладе, представленной вакцинным штаммом А/Brisbane/10/2007. Но кроме того, было выявлено небольшое число (6%) изолятов, последовательность НА которых характеризовалась наличием аминокислотных замен Е62К, N144К, К158N и N189К подобно референс-штамму А/Perth/16/2009 (впоследствии рекомендованном к включению в состав вакцины). Схожие результаты были получены исследовательским коллективом из Уганды (Byarugaba, 2011): пул изученных ими изолятов вируса гриппа А(Н3N2) по структуре поверхностных гликопротеинов был неоднороден – часть была подобна вакцинному штамму А/Brisbane/10/2007, а часть – генетически близка к штаммам А/Victoria/208/2009 и А/Perth/16/2009, относящимся к другой кладе.

По данным НИИ гриппа (Санкт-Петербург) (Грудинин, 2012), изолированные на территории РФ, вирусы гриппа А(Н3N2) эпидемических сезонов 2007-2009 гг. были генетически родственны вакцинному штамму А/Brisbane/10/2007 и характеризовались наличием аминокислотных замен G50E и K140I в НА и замен N93D, H150R и Y194I в NA. Кроме того, штаммы, изолированные в Москве, выделялись в отдельный филогенетический кластер в пределах клады Brisbane/10 и характеризовались наличием аминокислотной замены K92R в НА и синонимичными нуклеотидными заменами A351G и G408A в NA.

В статье авторов из НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (Силуянова, 2013) были описаны штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг., изолированные в Москве и в Липецке

(т.е. в европейской части РФ). Эти штаммы по аминокислотным последовательностям HA и NA были родственны штаммам клады Brisbane/10, но при этом содержали аминокислотные замены, не встречающиеся в штаммах, циркулировавших в других странах (T10M в HA, P154S в NA). Также авторами было отмечено отсутствие аминокислотных замен в NA, обуславливающих снижение чувствительности вируса гриппа к этиотропным препаратам - ингибиторам нейраминидазы озельтамивиру (E119V, R292K, N294S) и занамивиру (Q136K).

По результатам наших исследований низкая степень гетерогенности выявлена у пула аминокислотных последовательностей HA исследованных штаммов (HA трех штаммов полностью идентичны, а два оставшихся содержат по одной замене), в то время как совокупность аминокислотных последовательностей NA характеризуется выраженной гетерогенностью (идентичность не выявлена, эволюционные дистанции превышают значения, показанные для HA). Согласно анализу генетических дистанций между штаммами и филогенетическому анализу, на нуклеотидном уровне для пула исследованных последовательностей как HA, так и NA характеризуются гетерогенностью. При этом, несмотря на различия как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне, все исследованные штаммы принадлежали к генетической кладе штамма A/Brisbane/10/2007.

В аминокислотных последовательностях HA исследованных штаммов вируса гриппа A(H3N2), изолированных в азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг., обнаружены описанные в отчетах ВОЗ (WHO, 2008) ключевые замены G50E и K140I относительно HA штамма A/Wisconsin/67/2005, характерные для A/Brisbane/10/2007-подобных штаммов вируса гриппа. Кроме того, обнаружена аминокислотная замена K173Q относительно штамма A/Brisbane/10/2007, которая, по данным ВОЗ, была характерна для большинства штаммов вируса гриппа A(H3N2) выделенных в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг. и была результатом генетического дрейфа от эталонного штамма A/Brisbane/10/2007.

В аминокислотных последовательностях NA обнаружены ранее описанные в отчетах ВОЗ (WHO, 2008) генетические маркеры H150R, V194I, Y310H, L370S, S372L и N387K относительно NA штамма A/Wisconsin/67/2005, характерные для клады Brisbane/10. Но, кроме того, обнаружены замены D147N и I215V относительно вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007, которые согласно более позднему отчету ВОЗ (WHO, 2011) обуславливают принадлежность штаммов к кладам Peth/16 и Victoria/208. Согласно отчету ВОЗ – эти замены встречались в большинстве штаммов вируса гриппа A(H3N2), исследованных в эпидемический сезон 2008-2009. Именно эти дополнительные замены указывают на генетический дрейф от штамма A/Brisbane/10/2007 и обуславливают исключение NA исследованных нами штаммов из клады Brisbane/10. Большое количество штаммов вируса гриппа A(H3N2), выделенных в Европе в сезон 2008-2009 гг., содержали замены P386H и I464L. Таким образом, по наличию ключевых

аминокислотных замен в NA, штаммы сезона 2010-2011 гг., исследованные в рамках этой работы (кроме A/Novosibirsk/31/2009), близки к эталонному штамму A/Perth/16/2009. Из штаммов вируса гриппа, выделенных в азиатской части РФ, аминокислотные замены P386H и I464L относительно A/Brisbane/10/2007 были обнаружены только в штамме A/Novosibirsk/31/2009, что позволяет сделать заключение, что NA этого штамма представляет собой дрейфовый вариант, близкий к NA штамма A/Victoria/208/2009. Помимо описанных в отчете ВОЗ аминокислотных замен в NA, в нескольких из исследованных штаммов были выявлены замены D151G, E221D, D339N и D463N, и кроме того, в штамме A/Novosibirsk/1211/2009 было обнаружено несколько спорадических замен (не встречающихся в других штаммах сезона): I30V, S315R, T325P.

В целом, наличие аминокислотных замен, описанных в отчетах ВОЗ, указывает на сходство (по структуре NA) исследованных нами изолятов с вакцинным штаммом A/Brisbane/10/2007 и с подобными ему штаммами, выделенными на территории других стран. С другой стороны, обнаружены замены, отличающие изолированные в азиатской части РФ штаммы от вакцинного штамма A/Brisbane/10/2007. Таким образом, по NA исследованные штаммы представляли собой дрейфовые варианты относительно штамма A/Brisbane/10/2007, но все еще относились к кладе Brisbane/10. По структуре NA исследованные штаммы уже не принадлежали к кладе Brisbane/10 и представляли собой промежуточные дрейфовые варианты, близкие к кладам Perth/16 и Victoria/208. Результаты анализа генетических дистанций, филогенетический анализ и гетерогенность последовательностей NA указывают на то, что генетический дрейф происходил по нескольким направлениям и вирусы гриппа A(H3N2), циркулировавшие в азиатской части РФ в 2008-2009 гг. были занесены извне.

В течение **сезона 2009-2010** гг. на территории азиатской части РФ нами не было обнаружено вирусов гриппа A(H3N2) и B – они были вытеснены пандемическим вирусом гриппа A(H1N1) pdm09.

Согласно отчетам ВОЗ – в течение **эпидемического сезона 2010-2011** гг. в мире преобладал вирус гриппа A(H1N1) pdm09, но в отличие от предыдущего эпидемического сезона – возросла доля вирусов гриппа A(H3N2) и B (грипп B превалировал над гриппом A(H3N2)). По нашим данным, в азиатской части РФ также в основном обнаруживался вирус гриппа A(H1N1) pdm09, следующим по распространенности был грипп B и меньше всего было выявлено гриппа A(H3N2).

Вирусы гриппа A(H3N2), циркулировавшие в мире в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. по структуре NA принадлежали к двум генетическим кладам: Perth/16 и Victoria/208, с последующей дифференциацией на подгруппы в пределах этих кладов (WHO, 2011). Антигенные свойства генетически различных вирусов гриппа A(H3N2), принадлежащих

к разным кладам, были схожими и в состав вакцины был включен только эталонный штамм A/Perth/16/2009. При этом соотношение штаммов разных клад было различным в разных странах.

Согласно исследованиям, проведенным в Онтарио (Канада) (Eshaghi, 2014), по структуре гена HA из 41 штамма вируса гриппа A(H3N2) всего 3 относились к кладе Perth/16, а остальные штаммы представляли 4 генетических подгруппы клады Victoria/208 и содержали от 5 до 11 аминокислотных замен относительно вакцинного штамма A/Perth/16/2009. У 88% вирусов были обнаружены общие 8 мутаций, отличающих их от A/Perth/16/2009 и расположенных в антигенных сайтах A (K144N), C (D53N, E280A), D (T212A, S214I, I230V) и E (K62E, Y94H). Из этих мутаций в рассмотренных нами последовательностях HA российских штаммов была обнаружена только замена S214I (во всех трех штаммах эпидемического сезона 2010-2011 гг.). Используя систему FluSurver (<http://flusurver.bii.a-star.edu.sg>) нами было показано, что серин в положении 214 характерен для небольшого количества штаммов (в том числе и для A/Perth/16/2009), а в 99,11% (10636 последовательностей HA) случаев в этой позиции обнаруживается изолейцин. Кроме того, авторы сообщили об аминокислотной замене I140M (в HA), которая была обнаружена в 37% (15 из 41) штаммов A(H3N2) и не встречалась в других штаммах, выделенных в мире и в Канаде. Но в настоящее время, известно, что эта аминокислотная замена обнаруживалась в штаммах, циркулировавших в разных странах (с 2009 г. по 2016 г.), хотя частота ее выявления оказалась невысокой. По данным системы FluSurver мутация I140M была обнаружена 174 раза (в 1,62% всех последовательностей HA A(H3N2)) в 17 странах мира. В том числе в России на территории Москвы, Санкт-Петербурга, Мурманска и Новосибирска (штамм A/Novosibirsk/3k/2013). Т.е. аминокислотная замена, которая была отнесена к спорадическим по частоте встречаемости в штаммах вируса гриппа A(H3N2), циркулировавших в азиатской части РФ – в других географических регионах (в первую очередь Канада, США и Сингапур) была зафиксирована в вирусной популяции. Схожие результаты были получены в Квебеке (Канада) (Julie Ann, 2013). В отличие от рассматриваемого в этой работе региона – в Квебеке в сезон 2009-2010 гг. были выявлены штаммы A(H3N2). Т.е. штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг., относящиеся к кладе Brisbane/10 в Квебеке сменились на штаммы 2009-2010 гг., которые принадлежали к двум кладам: Perth/16 (1 штамм) и Victoria/208 (3 штамма). При этом штаммы двух клад содержали общие аминокислотные замены относительно предыдущего эталонного штамма A/Brisbane/10/2007 – K158N и N189K. Учитывая, что A/Perth/16/2009- и A/Victoria/208/2009-подобные штаммы отличаясь генетически были схожи антигенно, можно предположить, что антигенный дрейф от штамма A/Brisbane/10/2007 в первую очередь был обусловлен именно этими двумя мутациями. В течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. в Квебеке обнаруживались вирусы гриппа

A(H3N2) принадлежащие только к кладе Victoria/208, но эти штаммы несмотря на наличие аминокислотных замен в антигенных сайтах – все еще были антигенно схожи с актуальным вакцинным штаммом A/Perth/16/2009, что коррелировало с сохранением этого штамма в составе вакцины на следующий эпидемический сезон (2011-2012 гг.).

В Италии осуществлялся мониторинг циркуляции вирусов гриппа в постпандемический период (2010-2012 гг.) (Pariani, 2013a; Pariani, 2013b; Ebranati, 2015). В течение 2010-2011 гг. на севере Италии было собрано 273 положительных на грипп А или В пробы. В 4% проб был выявлен вирус гриппа А(H3N2), в 61,2% - А(H1N1) pdm09 и в 34,8% - вирус гриппа типа В. Из вирусов гриппа А(H3N2) 25% относились к кладе Perth/16 и 75% - к подгруппе 7 клады Victoria/208. Т.е. аналогично нашему исследованию в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. вирус гриппа А(H3N2) обнаруживался редко. Но при этом выявленные штаммы относились к кладе Victoria/208, в то время как штаммы, выделенные в азиатской части РФ принадлежали кладе Perth/16.

В Ханчжоу (Китай) в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. вирус гриппа А(H3N2) был представлен только штаммами подгруппы 6 клады Victoria/208 (Shao, 2014). В аминокислотных последовательностях НА были обнаружены замены в антигенных сайтах С, D и E относительно вакцинного штамма A/Perth/16/2009: D53N и E270A (С), I230V (D), Y94H (E). В Шанхае (Китай) с 2009 г. циркулировали штаммы, принадлежащие к двум генетически различным кладам: Perth/16 и Victoria/208 (Cai, 2014). При этом в сезоне 2009-2010 гг. (когда, согласно нашим исследованиям, в РФ полностью доминировал пандемический вариант вируса гриппа А(H1N1) pdm09) в Шанхае наряду с пандемическим вариантом вируса гриппа циркулировали вирусы гриппа А(H3N2) и В. Из 42 штаммов А(H3N2) сезона 2009-2010 гг., для которых были определены первичные структуры гена НА, 37 принадлежали к кладе Perth/16 и содержали характерные аминокислотные замены N144K (антигенный сайт А), K158N, N189K в антигенном сайте В. Остальные 5 штаммов (изолированы в конце сезона 2009-2010 гг.) по структуре НА относились к генетической подгруппе 5 клады Victoria/208 и содержали замены D53N, Y94H, I230V в антигенных сайтах С-Е, а также замену E280T/A. В течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. в Шанхае было выделено 17 штаммов вируса гриппа А(H3N2) и все они относились к подгруппе 5 клады Victoria/208.

Согласно исследованиям, проведенным в Камбодже (Norm, 2014), на территории этой страны в 2009 г. выделялись штаммы вируса гриппа А(H3N2), которые относились к кладе Perth/16 (с характерными аминокислотными заменами E62K, N144K, K158N, K173Q и N189K), в 2010 г. уже циркулировали вирусы генетической группы 5 (Y94H, I230V и E280A) клады Victoria/208, на смену которым в 2011 г. пришли штаммы генетической группы 3С (S45N, T48I, A198S, V223I и N312S) этой же клады.

Интересные данные были предоставлены группой авторов из Японии, которые провели анализ внесезонной вспышки вируса гриппа А(Н3N2) в июле 2010 года в г. Ниигата в больнице для пожилых людей (Dapat, 2011). Для 7 штаммов были определены первичные структуры всех сегментов генома. В результате филогенетического анализа было показано, что все штаммы были схожи между собой и формировали отдельный филогенетический кластер. По структуре НА штаммы были генетически родственны вакцинному штамму А/Perth/16/2009, но все же отличались от него 5 аминокислотными заменами в антигенных сайтах (P162S), С (E50K), D (S214I) и E (I260M и R261Q) характерными для генетической подгруппы 1 клады Perth/16, что позволило считать исследованные штаммы дрейфовым вариантом относительно А/Perth/16/2009. Согласно филогенетическому анализу по остальным генам – исследованные штаммы представляли собой реассортанты: кроме НА, также PA и NP оказались схожи с соответствующими сегментами генома штамма А/Perth/16/2009, в то время как NA, PB2 и PB1 оказались генетически ближе к штамму А/Victoria/208/2009, а по структуре генов MP и NS японские штаммы были генетически родственны предыдущему вакцинному штамму А/Brisbane/10/2007. Это исследование доказывает, что эволюция и изменчивость вирусов гриппа, циркулировавших в человеческой популяции может обуславливаться не только точечными аминокислотными заменами, но и реассортацией между штаммами различных генетических клад. Вероятно, в данном случае реассортация стала результатом совместной циркуляции вирусов гриппа А(Н3N2) клад Perth/16 и Brisbane/10 в предыдущий сезон (2009-2010 гг.).

Согласно данным, представленным в статьях российских авторов (Силуянова, 2013; Грудинин, 2012), в течение сезона 2009-2010 гг. не было выявлено циркуляции вируса гриппа А(Н3N2), а в сезон 2010-2011 гг. участие этого субтипа вируса в эпидемическом процессе было незначительным. Примечательно, что в эпидемический сезон 2010-2011 гг. в европейской части РФ обнаруживались штаммы генетической клады Victoria/208, а на востоке страны – штаммы генетической клады Perth/16 (с заменами E62K, N144A, R261Q) (Грудинин, 2012). Все штаммы вируса гриппа А(Н3N2) сезона 2010-2011 гг., описанные в статье Силуяновой Э.В., были изолированы во Владивостоке, относились к генетической кладе Perth/16 и несли аминокислотные замены E62K, N189K, N144K, I260M, P162S, R261Q в НА и L338F, N342D, N402D в NA, а также были генетически близки к штаммам, преимущественно циркулировавшим в Восточной Азии (Китай, Япония).

Штаммы вируса гриппа А(Н3N2), исследованные в рамках нашей работы, по наличию ключевых замен E62K, N144K, K173Q, K158N и N189K относительно НА штамма А/Brisbane/10/2007 принадлежали к генетической кладе Perth/16 (WHO, 2011), а по наличию замен E50K, P162S, I260M и R261Q – к генетической подгруппе 1 этой клады. По

первичной структуре NA, исходя из наличия аминокислотных замен D127N, I307M, L338F и N342D все исследованные штаммы эпидемического сезона 2011-2012 также относятся к подгруппе 1 генетической клады Perth/16.

Согласно отчету ВОЗ (WHO, 2011), ближе к концу эпидемического сезона 2010-2011 гг. в мире среди вирусов гриппа A(H3N2) уже преобладали штаммы, относящиеся к генетической кладе Victoria/208. Но среди изолятов, выделенных и исследованных в рамках этой работы, не было обнаружено штаммов, принадлежащих к этой кладе. В целом, полученные нами данные о циркуляции вируса гриппа A(H3N2) генетической клады Perth/16 в азиатской части РФ подтверждают и дополняют результаты, представленные в русскоязычных литературных источниках (Силуянова, 2013; Грудинин, 2012). Примечательно, что штаммы вируса гриппа A(H3N2), выделенные в эпидемический сезон 2010-2011 гг. в Новосибирске (исследованы в рамках этой работы) и во Владивостоке (Силуянова, 2013) по структуре HA генетически близки к штаммам, вызвавшим внесезонную вспышку летом 2010 года в Японии (Dapat, 2011). Согласно системе BLAST, интегрированной в платформу GISAID, HA новосибирских штаммов и штаммов из г. Ниигата максимально идентичны (>99%) и отличаются всего двумя нуклеотидными заменами.

По отчетам ВОЗ в эпидемическом сезоне 2011-2012 гг. преобладающим субтипом вируса гриппа был A(H3N2) (в отличие от предыдущего сезона, когда преобладал субтип A(H1N1)). Доля вируса гриппа типа В в общем пуле была меньше, чем в предыдущий сезон – он обнаруживался реже, чем A(H3N2), но все же чаще чем A(H1N1). Согласно результатам, полученным в рамках этой работы, на территории азиатской части РФ в эпидемический сезон 2011-2012 гг. были изолированы штаммы вирусов гриппа A(H3N2) (92%) и В (8%), т.е. этиологическая структура пула вирусов гриппа была близка к наблюдаемой в мире в целом.

По структуре HA ВОЗ подразделяет вирусы гриппа A(H3N2) эпидемического сезона 2011-2012 гг. на две генетические клады: Perth/16 и Victoria/208. В пределах клады, согласно наличию ключевых аминокислотных замен, было выделено 7 генетических групп: две в пределах клады Perth/16 и пять в пределах клады Victoria/208 (кроме того, группа 3 клады Victoria/208 была разделена на 3 подгруппы).

По структуре NA штаммы вируса гриппа A(H3N2), циркулировавшие в мире в эпидемический сезон 2011-2012 гг. принадлежали в генетическим кладам Perth/16 и Victoria/208 и, аналогично классификации на основе структуры HA, подразделялись на 7 генетических групп. В пределах группы 3 клады Victoria/208 также выделялись три подгруппы – 3А, 3В, 3С.

Большинство выделенных в мире в целом штаммов вируса гриппа A(H3N2) принадлежали генетическим группам 3, 5 и 6 клады Victoria/208 (WHO, 2012). В частности, в Греции циркулировали вирусы гриппа A(H3N2) подгрупп 3 (А, В и С) и 6 клады Victoria/208



(Kossovakis, 2015). Большинство штаммов (91,9%) принадлежали к подгруппе 3, в пределах которой к группе 3А относилось 46,0%, 3В – 35,1% и 3С – 10,8%. Аминокислотные замены (по 19 позициям) относительно вакцинного штамма A/Perth/16/2009 были обнаружены во всех пяти антигенных сайтах. На территории Индии также циркулировали штаммы клады Victoria/208, схожие со штаммом A/Victoria/361/2011 и принадлежащие к генетической подгруппе 3 с характерными мутациями N145S; A198S; V223I и N312S в HA (Amita Jain, 2015). На севере Италии выделялись штаммы вируса гриппа A(H3N2) клады Victoria/208, принадлежащие к подгруппам 6 (1/3 от общего количества штаммов) и 3 (2/3 штаммов) (Pariani, 2013b). В пределах группы 3 штаммы подразделялись на подгруппы: А (33,3%), В (33,3%) и С (4,8%). Подгруппа 3А характеризовалась наличием аминокислотной замены N144D в антигенном сайте А последовательности HA. Подгруппа 3В характеризовалась аминокислотными заменами A198S/P и N312S в антигенных сайтах В и С. Для подгруппы 3С была характерна замена S145N. В HA штаммов подгруппы 6 обнаруживались ключевые замены D53N, Y94H, S199A, I230V и E280A в антигенных сайтах В–Е. Согласно исследованиям, проведенным на Кубе - все штаммы A(H3N2), изолированные в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., принадлежали к подгруппе 6 клады Victoria/208 и характеризовались наличием замен D53N и E280A (антигенный сайт С), Y94H (антигенный сайт Е), I230V (антигенный сайт D) и S199A (Arencibia, 2014). На Корсике (Франция) циркулировавшие вирусы гриппа A(H3N2) принадлежали генетической подгруппе 3 клады Victoria/208 (Fantoni, 2014). Все штаммы содержали как минимум 4 общих аминокислотных замены в HA относительно вакцинного штамма A/Perth/16/2009: N145S (антигенный сайт А), Q156H и V186G (антигенный сайт В) и Y219S (антигенный сайт D).

В России, согласно литературным данным, в эпидемический сезон 2010-2011 гг. вирусы гриппа A(H3N2) были представлены генетическими подгруппами 3А и 3С клады Victoria/208. (Силуянова, 2013; Грудинин, 2012).

Все штаммы вируса гриппа A(H3N2), изученные в рамках этой работы, по первичной структуре HA и NA относились к группе 3 генетической клады Victoria/208. А в пределах этой группы, по наличию ключевых аминокислотных замен, рассмотренные штаммы принадлежали подгруппам 3В (1 штамм) и 3С (9 штаммов). В целом, можно отметить, что по паттерну аминокислотных замен изученные нами штаммы сезона 2011-2012 гг. значительно отличались как от штаммов предыдущего сезона (выделенных в азиатской части РФ) так и от актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009. Кроме того, штаммы двух последовательных сезонов 2010-2011 гг. и 2011-2012 гг. принадлежали к разным генетическим кладам. Можно заключить, что вирусы 2011-2012 гг. не являлись результатом эволюции вирусов 2010-2012 гг., а были привнесены извне.

**В течение эпидемического сезона 2012-2013** гг. в мире циркулировали вирусы гриппа типа А и типа В, с преобладанием гриппа А. Грипп типа А был представлен субтипами А(Н3N2) и А(Н1N1) pdm09, при этом сложилась ситуация, обратная наблюдаемой в предыдущий эпидемический сезон – вирус гриппа А(Н1N1) pdm09 детектировался чаще, чем А(Н3N2). Согласно нашим исследованиям, в азиатской части РФ характер изоляции вирусов гриппа отличался от общемирового – из 1287 пробы было выделено 195 изолятов вируса гриппа, из которых 85 (43%) относились к гриппу А(Н3N2), 11 (6%) – к гриппу А(Н1N1) pdm09 и 100 (51%) – к гриппу типа В. При этом в целом для России было характерно преобладание гриппа типа А над гриппом типа В в пуле обнаруживаемых вирусов, а также преобладание А(Н1N1) pdm09 над А(Н3N2). Ситуация, сходная с наблюдаемой нами в азиатской части РФ оказалась также характерна для нескольких стран: Англия, Дания, Ирландия, Шотландия и Казахстан (WHO, 2013).

Вирусы гриппа А(Н3N2), циркулировавшие в мире в эпидемический сезон 2012-2013 гг. принадлежали к генетической кладе Victoria/208. В пределах этой клады было выделено несколько генетических групп (аналогично предыдущему эпидемическому сезону). В первой половине эпидемического сезона обнаруживались штаммы, по структуре НА и NA относящиеся в большинстве случаев к генетической группе 3 (подгруппы 3А, 3В и 3С), а также к группам 5 и 6.

Во второй же половине эпидемического сезона наибольшее распространение получили варианты вируса, относящиеся к генетическим подгруппам 3В и 3С группы 3. Кроме того, ранее описанные (в начале эпидемического сезона) филогенетические ветви в пределах подгруппы 3С получили большее распространение и были названы 3С.1, 3С.2 и 3С.3. Появление этих групп коррелирует с генетическим дрейфом в пределах одного эпидемического сезона.

Штаммы вируса гриппа А(Н3N2), изолированные в азиатской части РФ в течение эпидемического сезона 2012-2013 гг. по структуре НА относились к генетической подгруппе 3С группы 3, а наличие ряда аминокислотных замен, отличающих исследованные штаммы от актуального вакцинного штамма A/Victoria/361/2011 позволяет считать их дрейфовыми вариантами вируса и отнести к суб-группе 3С.3. Изоляты вируса гриппа были выделены в нескольких удаленных друг от друга населенных пунктах. При этом НА всех штаммов характеризовались сходными паттернами распределения аминокислотных замен, хотя и с рядом вариabельных в пределах сезона позиций. Следовательно, либо имели место множественные заносы схожих вариантов вируса, либо вирусы гриппа именно группы 3С.3 с выявленным паттерном распределения аминокислотных замен оказались наиболее приспособлены для циркуляции на территории азиатской части РФ.

По структуре NA для вирусов гриппа A(H3N2), циркулировавших в эпидемический сезон 2012-2013 гг. в мире в целом была характерна меньшая степень изменчивости, чем в случае в HA. Так, исследованные в рамках этой работы штаммы, выделенные в азиатской части РФ характеризовались высокой степенью идентичности аминокислотной последовательности NA. Из 11 изолятов всего три отличались от остальных единичными аминокислотными заменами. Исходя из наличия ключевой замены D93G исследованные штаммы по структуре NA можно отнести к генетической подгруппе 3C (группа 3, клада Victoria/208).

Все вирусы гриппа типа В, изолированные в эпидемический сезон 2008-2009 гг. в азиатской части РФ принадлежали к генетической линии В/Victoria. По данным ВОЗ (WHO, 2009) для первичной структуры HA штаммов вируса гриппа В линии В/Victoria в эпидемический сезон 2008-2009 гг. были характерны аминокислотные замены N75K, V146I, N165K и N172P относительно предыдущего вакцинного штамма В/Malaysia/2506/2004. Эти замены являются маркерами В/Brisbane/60/2008-подобных штаммов вируса гриппа и присутствуют во всех исследованных нами последовательностях. Штаммы, выделенные не только в азиатской части РФ, но и на всей территории страны (в основном – в европейской части) также принадлежали к генетической линии В/Victoria и содержали аминокислотные замены, характерные для В/Brisbane/60/2008-подобных штаммов (Иванова, 2011; Лобова, 2012).

Для нейраминидазы штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, циркулировавших в мире в эпидемический сезон 2008-2009 гг., характерны ключевые аминокислотные замены K125N, I204V, N220K, E320D, D329N, A358E и E404K (WHO, 2009). Все эти замены обнаружены в аминокислотных последовательностях NA исследованных нами штаммов. Кроме того, выявлены замены G378E и D463N относительно В/Brisbane/60/2008, что свидетельствует о дрейфе от актуального вакцинного штамма.

Согласно анализу дистанций между исследованными последовательностями, а также исходя анализа филогенетических связей, можно отметить гомогенность (как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне) пула выделенных в эпидемический сезон 2008-2009 гг. штаммов вируса гриппа типа В.

В течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. циркулировавшие в мире вирусы гриппа типа В принадлежали к генетическим линиям В/Victoria и В/Yamagata, с преобладанием вирусов линии В/Victoria.

В основном, изоляты вируса гриппа В линии В/Victoria, выделенные в мире в эпидемический сезон 2010-2011 гг., по структуре NA относились к генетической клада 1 «Brisbane/60» (согласно наличию маркерных аминокислотных замен N75K, N165K и S172P). В пределах клады Brisbane/60 вирусы подразделялись на две основные филогенетические группы,

характеризующиеся наличием замен V146I в одном случае и L58P – в другом. Но кроме вируса гриппа В клады Brisbane/60 в сезон 2010-2011 гг. в незначительном количестве обнаруживались варианты вируса, близкородственные предыдущему вакцинному штамму В/Malaysia/2506/2004.

По первичной структуре НА большинство циркулировавших в мире штаммов принадлежали к генетической кладе 1 «Brisbane/60» (характеризуется комбинацией аминокислотных замен P41S, K125N, E320D, E404K, N463D, I204V, N220K и A358E). Кроме того, как и в случае с НА, меньшая часть выделенных изолятов вируса гриппа В относилась к нескольким подгруппам, филогенетически более близким к предыдущему вакцинному штамму В/Malaysia/2506/2004.

В целом, для вирусов гриппа В генетической линии В/Victoria, циркулировавших в мире в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. характерна более выраженная изменчивость нейраминидазы, чем гемагглютанина – именно в нейраминидазе происходило большее число аминокислотных замен. Кроме того, можно отметить случаи реассортации – некоторые выделенные штаммы по структуре НА и NA принадлежали к разным генетическим кладам.

Согласно данным ВОЗ, штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, циркулировавших в мире в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг., в большинстве, содержали маркерные аминокислотные замены S150I, N165Y, G229D в НА и принадлежали к генетической кладе В/Bangladesh/3333/2007. Незначительная часть выделенных изолятов, содержащих в структуре НА аминокислотные замены R48K, P108A и T181A, относилась к генетической кладе 2 «Brisbane/3».

По структуре НА штаммы гриппа В генетической линии В/Yamagata, выделенные в эпидемический сезон 2010-2011 гг., за незначительным исключением также принадлежали к генетической кладе В/Bangladesh/3333/2007 и содержали ключевые аминокислотные замены Q42R, D463N и A465T. Часть исследованных ВОЗ штаммов относились к генетической кладе кладе 2 «Brisbane/3» и содержали маркерные аминокислотные замены I248V, T106I и S295R.

Все изоляты вируса гриппа В выделенные в эпидемический сезон 2010-2011 гг. и исследованные в рамках этой работы принадлежали к генетической кладе 1 «Brisbane/60» линии В/Victoria как по структуре НА, так и по структуре NA, что совпадает с результатами исследования вируса гриппа В генетической линии В/Victoria в мире в целом. Наличие ключевой аминокислотной замены L58P в НА, а также замен P51S, L73F и N199D в NA обуславливает локализацию исследованных последовательностей в отдельной филогенетической подгруппе клады 1 «Brisbane/60», дистанцированной от вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008. Позднее, в отчетах ВОЗ за 2013 год, для этой подгруппы было введено обозначение «1В».

**В эпидемическом сезоне 2011-2012** гг. в мире фиксировалась циркуляция вируса гриппа В обеих известных генетических линий – В/Victoria и В/Yamagata. При этом, в первой половине сезона преобладали штаммы линии В/Yamagata (WHO, 2012), но к концу сезона соотношение генетических линий составило 60% В/Victoria и 40% В/Yamagata (WHO, 2012). В сравнении же с предыдущими эпидемическими сезонами отмечалось возрастание доли вирусов генетической линии В/Yamagata в общем пуле гриппа В.

Согласно нашим исследованиям в эпидемическом сезоне 2011-2012 гг. в азиатской части РФ впервые с предпандемического эпидемического сезона 2008-2009 гг. зафиксирована выраженная совместная циркуляция вирусов гриппа В, принадлежащих к генетическим линиям В/Victoria и В/Yamagata. Аналогичные данные показаны для территории РФ в целом (Лобова, 2012).

По структуре НА все изолированные в мире в эпидемический сезон 2011-2012 гг. штаммы вируса гриппа В линии В/Victoria принадлежали к генетической кладе 1 Brisbane/60. Но филогенетически НА большинства исследованных штаммов были дистанцированы от актуального вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 (WHO, 2012), хотя и в меньшей степени, чем в предыдущий эпидемический сезон. Последовательности НА характеризовались более выраженной, чем в случае с НА, вариабельностью. Большинство исследованных ВОЗ штаммов гриппа В генетической линии В/Victoria относились к кладе 1 Brisbane/60, но ряд штаммов принадлежали к генетическим кладам 3 и 4. В результате, были зафиксированы случаи реассортации, когда по структуре НА штамм принадлежал к кладе 1, а по структуре NA – к кладам 3 или 4 (WHO, 2012).

Вирусы гриппа В генетической линии В/Victoria, выделенные на территории азиатской части РФ и исследованные в рамках этой работы, по структуре НА и NA принадлежали к генетической кладе 1 Brisbane/60, т.е. случаев реассортации между кладами обнаружено не было. При этом в пределах клады 1 исследованные штаммы характеризуются более выраженным (чем в случае с НА) генетическим дрейфом NA от NA актуального вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008.

Интересной является динамика идентичности НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria последовательностям НА вакцинных штаммов (актуального В/Brisbane/60/2008 и устаревшего В/Malaysia/2506/2004). К сезону 2008-2009 гг. циркулировавшие штаммы уже накопили максимальное количество аминокислотных замен относительно штамма В/Malaysia/2506/2004 и идентичность исследуемых последовательностей НА по отношению к НА этого штамма колебалась, не достигая 99% (рис. 43). В то время как идентичность относительно актуального вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 превышала 99,4% в сезон 2008-2009 гг., но затем в постпандемический сезон 2010-2011 гг. значительно

снизилась и приблизилась к уровню В/Malaysia/2506/2004. В следующем же эпидемическом сезоне 2011-2012 гг. произошло обратное повышение степени идентичности актуальному вакцинному штамму В/Brisbane/60/2008. Такие колебания идентичности показывают, что хотя генетическое разнообразие вирусов гриппа В линии В/Yamagata и не менялось настолько кардинально, чтобы появилась необходимость замены вакцинного штамма (как в случае с А(Н3N2)), все же пандемия А(Н1N1) pdm09, вероятно, оказала влияние на динамику их изменчивости.

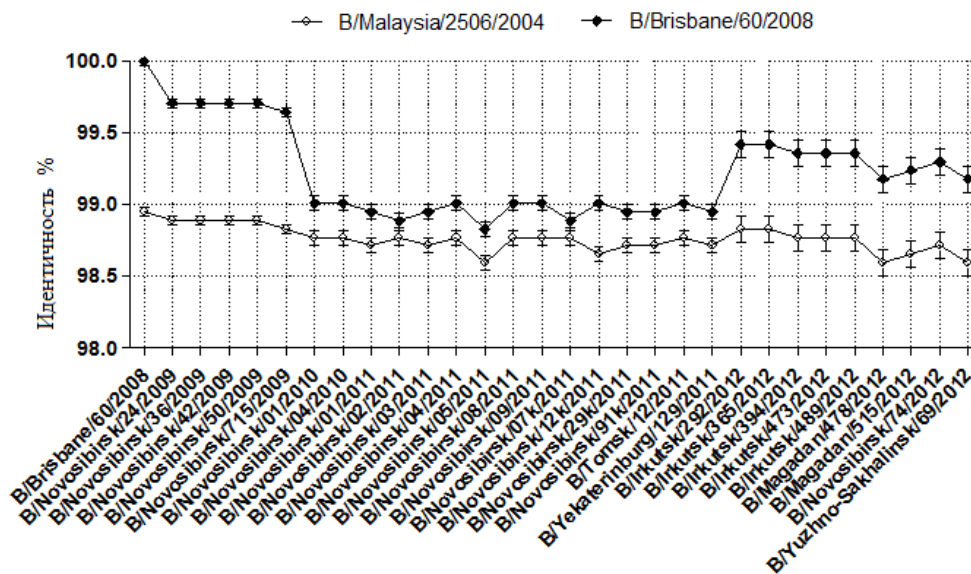


Рисунок 43. Идентичность (величина, обратная эволюционной дистанции) штаммов вируса гриппа В предыдущему (В/Malaysia/2506/2004) и актуальному (В/Brisbane/60/2008) вакцинным штаммам.

Штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, циркулировавшие в мире на протяжении эпидемического сезона 2011-2012, как по структуре НА, так и по структуре NA подразделялись на две генетические клады: 2 (Brisbane/3) и 3 (Bangladesh/3333). При этом в первой половине эпидемического сезона преобладали штаммы клады 3, а во второй половине сезона – соотношение приблизилось к 1:1. Вакцинным штаммом на эпидемический сезон 2011-2012 гг. являлся В/Wisconsin/1/2010, относящийся в кладе 3 (Bangladesh/3333). Клада 3 характеризовалась вариабельностью структур НА и подразделялась на несколько дистанцированных друг от друга филогенетических групп (по наличию ключевых аминокислотных замен): группа В/Wisconsin/1/2010 с аминокислотной заменой N202S, группа, определяемая заменой T181K, группа с заменами M251V, T181A и K253R и группа с заменами K253R или V29A и L172Q. По структуре NA клада 3 подразделялась на группы схожим образом.

Все штаммы линии В/Yamagata, выделенные в эпидемический сезон 2011-2012 гг. на территории азиатской части РФ в рамках нашей работы, относились к кладе 3

(Bangladesh/3333). Из четырех изолятов – 3 принадлежали к группе В/Wisconsin/1/2010-подобных штаммов и содержали характерную аминокислотную замену N202S, а один штамм (В/Omsk/7/2012) принадлежал к другой генетической группе в пределах клады 3. Таким образом, можно заключить, что, несмотря на принадлежность исследованных Российских штаммов к одной генетической кладе, их циркуляция – результат нескольких независимых заносов патогена на рассматриваемую территорию. Кроме того, последовательности HA и NA штаммов В/Novosibirsk/34/2012, В/Vladivostok/103/2012 и В/Vladivostok/693/2012 характеризовались высокой степенью идентичности, при значительной географической удаленности городов, в которых были собраны образцы. Вероятно, именно такие генетические варианты В/Wisconsin/1/2010-подобных вирусов гриппа оказались наиболее адаптированными на территории азиатской части РФ.

Среди вирусов гриппа типа В, изолированных по всему миру в **эпидемический сезон 2012-2013 гг.** преобладали штаммы генетической линии В/Yamagata. Все исследованные нами штаммы также принадлежали к генетической линии В/Yamagata.

Согласно отчетам ВОЗ, большинство штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata принадлежали к кладе 2 (с референс-штаммами В/Estonia/55669/2011, В/Massachusetts/02/2012 и В/Hong Kong/3577/2012), а меньшая часть – относилась к кладе 3 (с вакцинным штаммом В/Wisconsin/1/2010 и референс-штаммами В/Stockholm/12/2011, В/Serbia/1894/2011 и В/Novosibirsk/1/2012). Все исследованные нами штаммы по структуре HA и NA принадлежали к кладе 2, что коррелирует с общемировой картиной.

#### **Значимость аминокислотных замен.**

В NA трех штаммов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг., в положении 151 были выявлены аминокислотные замены D151G и D151A. Известно, что аминокислотный остаток в положении 151 входит в состав активного центра NA (Varghese, 1983; Garman, 2005) и, следовательно, мутации по этому положению потенциально могут оказывать влияние на биологические свойства вируса. Мутация D151G ранее была описана, как часто встречающаяся после пассирования на культуре клеток MDCK и ассоциированная с увеличением способности NA связываться с рецепторами (Mohr, 2015; Zaraket, 2016). Кроме того, показано, что эта замена снижает чувствительность вируса к занамивиру (Mishin, 2014).

Замена D151A оказалась крайне редкой: с 1968 года она была обнаружена всего в 6 штаммах. Из них 2 выделены на территории РФ: рассмотренный в этой работе штамм А/Novosibirsk/707/2009, а также штамм А/Saint Petersburg/RII53/2012 из Санкт-Петербурга. В литературе эта мутация описывается как приводящая к снижению чувствительности вируса к

ингибитору нейраминидазы – занамивиру, в то время как на чувствительность к озельтамивиру эта мутация влияния не оказывает (Sheu, 2008).

Прочие аминокислотные замены, обнаруженные в HA и NA рассматриваемых штаммов, потенциально могут оказывать влияние на биологические свойства вирусов за счет своей локализации на поверхности гликопротеинов (в первую очередь, в антигенных сайтах), а также обуславливая потерю или приобретение сайтов гликозилирования.

Целесообразно более подробно рассмотреть параметры изменчивости HA, учитывая, что именно после изучения антигенных свойства вируса гриппа в реакции торможения гемагглютинации, оценивается степень изменения антигенных характеристик основного пула циркулирующих вариантов вируса и принимаются решения о внесении изменений в состав вакцины.

При смене эпидемических сезонов аминокислотные замены в HA исследованных штаммов вируса гриппа A(H3N2) происходили по 30 позициям (включая спорадические замены в отдельных штаммах). Из 30 позиций в HA всего 7 принадлежали к субъединице HA2. В 2 позициях из 7 произошли замены, обнаруженные в двух и более штаммах, т.е. минимум на протяжении одного эпидемического сезона эти мутации закрепились в популяции вируса гриппа A(H3N2). В субъединице HA1 замены происходили по 23 положениям. Из них всего 5 спорадических, выявленных в отдельных штаммах. Кроме того, 17 из 23 позиций расположены во всех пяти антигенных сайтах HA. В эти 17 также входят 4 позиции, по которым происходили спорадические замены. Таким образом, в HA1 вируса гриппа A(H3N2) аминокислотные замены (как зафиксировавшиеся, так и спорадические) происходили в основном в антигенных сайтах. При этом примечательно, что начиная с эпидемического сезона 2008-2009 гг. в мире уже циркулировали вирусы гриппа A(H3N2) двух генетически различных, но антигенно схожих клад: Perth/16 и Victoria/208. Эти две линии отличались заменами в антигенных сайтах, но при этом проявляли схожие антигенные характеристики. В частности, штаммы эпидемических сезонов 2010-2011 (клада Perth/16) и 2011-2012 (Victoria/208), рассмотренные в рамках этой работы отличались заменами по 11 позициям в антигенных сайтах. Но при этом, радикальных антигенных отличий не было обнаружено, что коррелирует с литературными данными и с рекомендациями ВОЗ по составу вакцины.

Из 14 позиций аминокислотных замен (включая спорадические замены) в HA штаммов вируса гриппа B генетической линии B/Victoria 4 принадлежали к субъединице HA2. В двух из них произошли замены, обнаруженные в двух и более штаммах. В субъединице HA1 замены происходили по 10 положениям. Из них 7 спорадических, выявленных в отдельных штаммах. К антигенным сайтам относятся 4 из 10 позиций аминокислотных замен в HA. При этом закрепились аминокислотные замены только в двух. Таким образом, в HA1 вируса гриппа B, в



отличие от вируса гриппа А(Н3N2), аминокислотные замены (как зафиксировавшиеся, так и спорадические) в антигенных сайтах происходили и фиксировались реже. Незначительное количество замен в целом в HA и в антигенных сайтах, в частности, коррелировало с тем, что на протяжении всех трех рассмотренных эпидемических сезонов циркуляции вируса гриппа В генетической линии В/Victoria вакцинным штаммов оставался В/Brisbane/60/2008. В штаммах вируса гриппа В линии В/Yamagata замены в HA происходили по 16 позициям. Из них всего одна относилась к субъединице HA2. Из 15 позиций аминокислотных замен в HA1 8 относились к антигенным сайтам. Штаммы эпидемических сезонов 2011-2012 и 2012-2013 гг. отличались 11 заменами (5 в антигенных сайтах) в HA1, встречающимися в двух и более штаммах. Такое количество замен коррелирует с изменением антигенных свойств вирусов и со сменой вакцинного штамма с В/Wisconsin/01/2010 на В/Massachusetts/02/2012.

**Филогенетические связи штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) и В, выделенных на территории азиатской части РФ, со штаммами, изолированными на всей территории РФ.**

Диссертационная работа сфокусирована на исследовании изменчивости поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа, выделенных в азиатской части РФ. Но территория РФ гораздо обширнее. Исходя из этого, целесообразно сравнить последовательности HA и NA, рассмотренные в рамках этой работы, с последовательностями HA и NA штаммов вируса гриппа, выделенных на всей территории РФ с 2008 по 2013 гг.. Результаты секвенирования геномов этих штаммов предоставлены в международные базы данных (GISAID и GenBank) исследовательскими коллективами из НИИ гриппа (Санкт-Петербург) и Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва).

В рамках этой работы было показано (рис. 44-45), что штаммы вируса гриппа А(Н3N2) эпидемического сезона, выделенные в азиатской части РФ в эпидемическом сезоне 2008-2009 гг. подразделялись на несколько филогенетических подгрупп (2 для HA и 3 для NA). Эти подгруппы филогенетические отличались от вакцинного штамма А/Brisbane/10/2007, но при этом содержали ключевые аминокислотные замены, характерные для Brisbane/10-подобных штаммов. Таким образом, эти штаммы были результатом генетического дрейфа с накоплением синонимичных нуклеотидных замен, которые обусловили филогенетические различия с вакцинным штаммом, но не затронули аминокислотные последовательности. Согласно филогенетическому анализу, на территории РФ выделялись штаммы, по генам, кодирующим HA и NA, схожие с рассмотренными в этой работе. Исключение составила последовательность NA штамма А/Novosibirsk/319/2009, отличающая его от других штаммов, изолированных в РФ. Возможно, что сегмент генома, кодирующий NA, был приобретен этим штаммом в процессе reassortации. При этом, все последовательности, доступные в базе данных GISAID, принадлежали штаммам, выделенным в европейской части РФ.

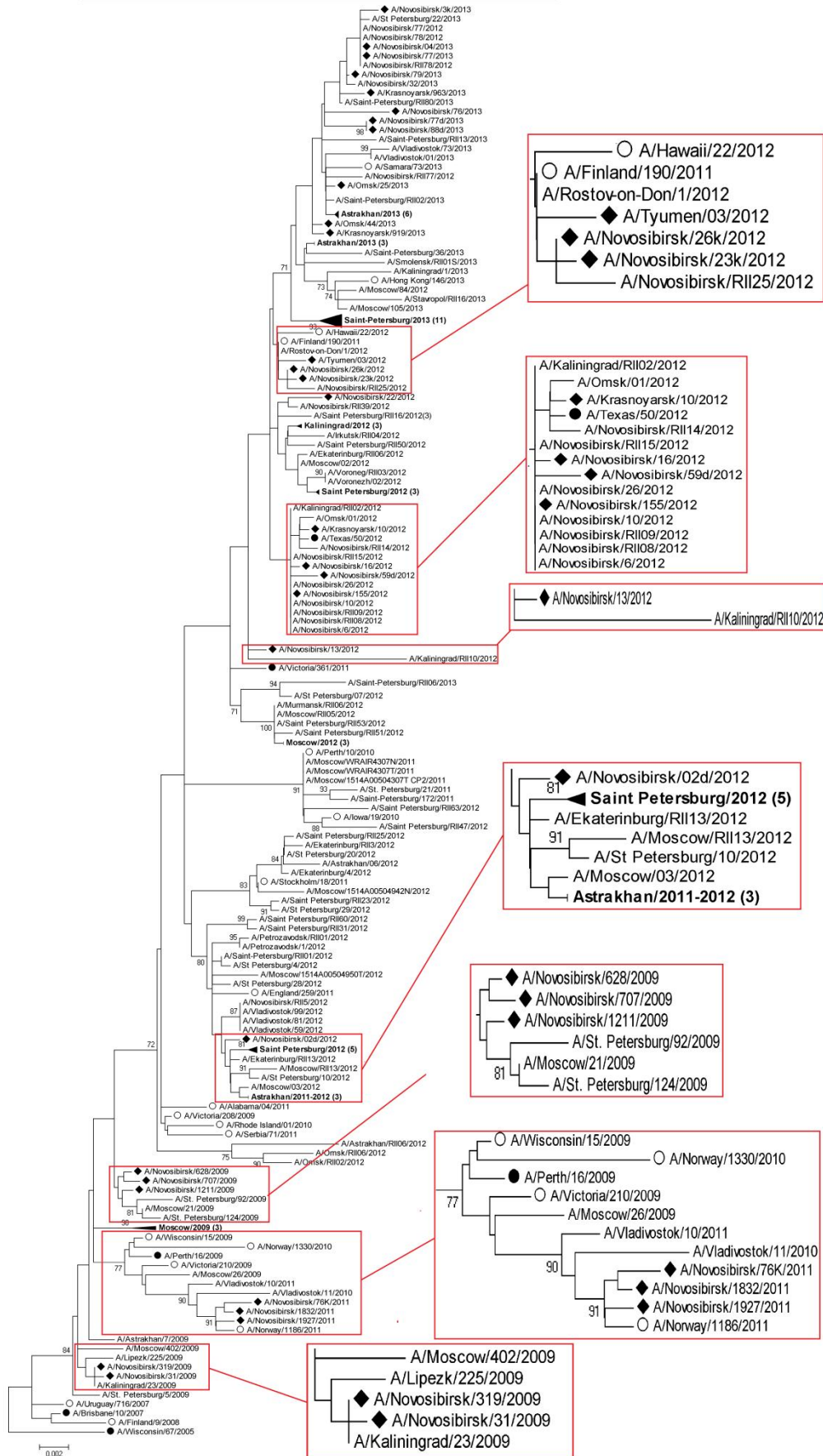


Рисунок 44. Филогенетические связи между НА штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) выделенных в РФ с 2008 по 2013 гг.

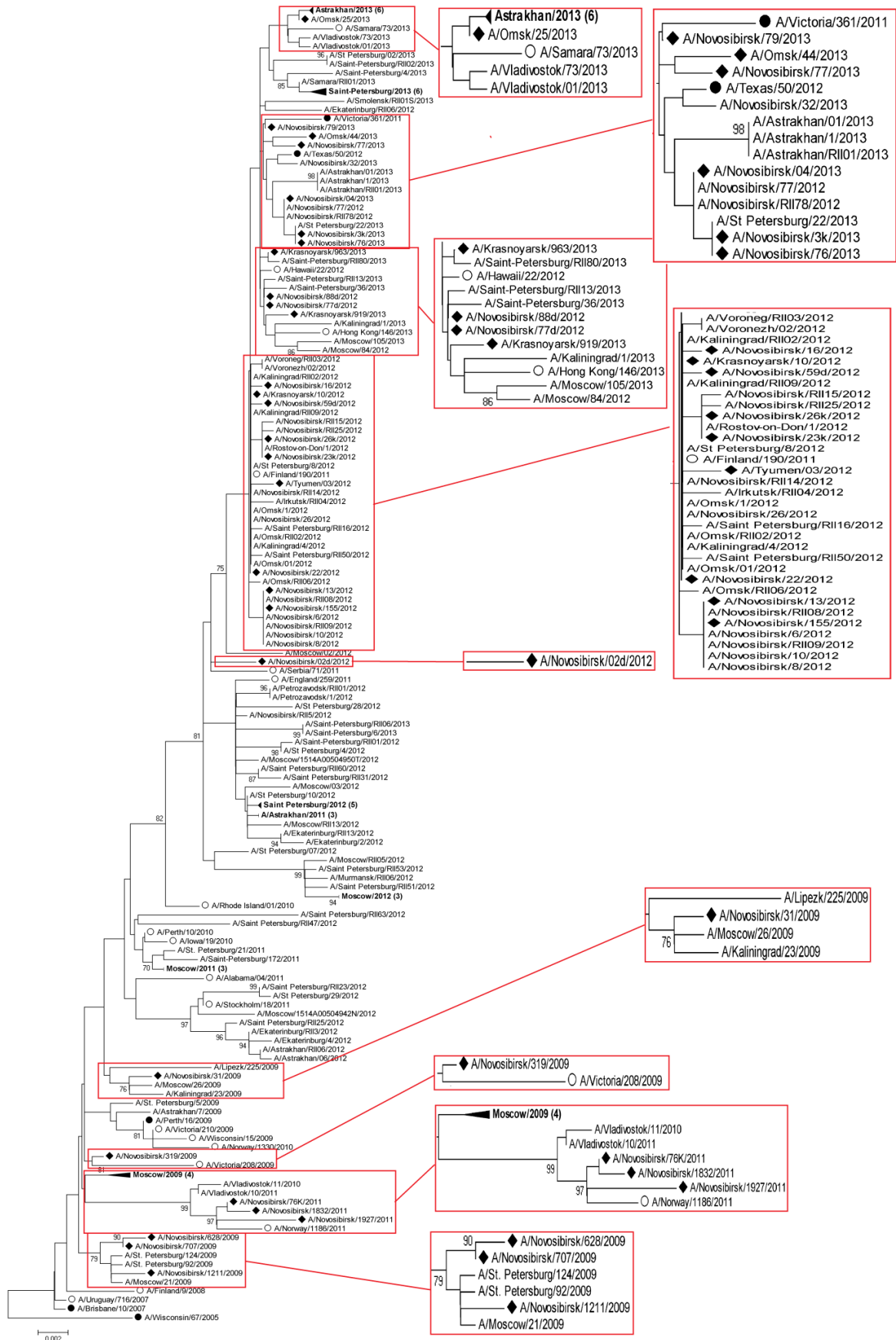


Рисунок 45. Филогенетические связи между NA штаммов вирусов гриппа А(Н3N2) выделенных в РФ с 2008 по 2013 гг.

С 2011 по 2013 гг. все штаммы вируса гриппа А(Н3N2), выделенные в РФ принадлежали к кладе Victoria/208. Большинство штаммов относились к генетическим подгруппам 3В и 3С (с дальнейшим разделением на более мелкие подгруппы 3С.1, 3С.2, 3С.3). Исключение составили штаммы, выделенные в Москве и Санкт-Петербурге в 2011-2012 гг. Эти штаммы образовывали отдельный филогенетический кластер и были подобны референс-штаммам А/Perth/10/2010 и А/Iowa/19/2010, которые принадлежали к генетическим подгруппам 5 и 6 клады Victoria/208. Среди штаммов, выделенных в азиатской части РФ подобных А/Perth/10/2010 и А/Iowa/19/2010 обнаружено не было.

Вирусы гриппа типа В (рис. 45-46) генетической линии В/Victoria, циркулировавшие в РФ в течение эпидемического сезона 2008-2009 и филогенетически близкие к вакцинному штамму В/Brisbane/60/2008 (клада 1А) в базе данных GISAID представлены 4 штаммами, выделенными в европейской части страны (Санкт-Петербург и Калининград) и 5 штаммами, изолированными в азиатской части и рассмотренными в этой работе. Филогенетически азиатские штаммы оказались близки к штаммам из Санкт-Петербурга.

В течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. на территории РФ выделялись штаммы А(Н3N2) обеих циркулирующих генетических клад: Victoria/208 и Perth/16. При этом большинство штаммов были изолированы в европейской части страны и принадлежали к кладе Victoria/208. Штаммы клады Perth/16, не рассматриваемые в рамках этой работы, были представлены одним штаммом из Москвы и двумя из Владивостока. Исследованные нами штаммы филогенетически близки к штаммам, выделенным во Владивостоке. Таким образом, в эпидемический сезон 2010-2011 гг. штаммы клады Victoria/208 выделялись в европейской части РФ, а клады Perth/16 – преимущественно в азиатской. Кроме того, согласно BLAST-анализу и филогенетическому анализу, установлено, что штаммы из Новосибирска и Владивостока близкородственны штаммам, выделенным на территории Японии и Китая, где преимущественно циркулировали штаммы именно клады Perth/16.

Все штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Victoria, выделенные в России в 2010-2011 гг., по-прежнему принадлежали Brisbane/60-подобным штаммам, но, в отличие от штаммов предыдущего сезона, к генетической кладе 1В, а не 1А. При этом, штаммы, выделенные в европейской и в азиатской частях страны формировали две отдельные филогенетические подгруппы.

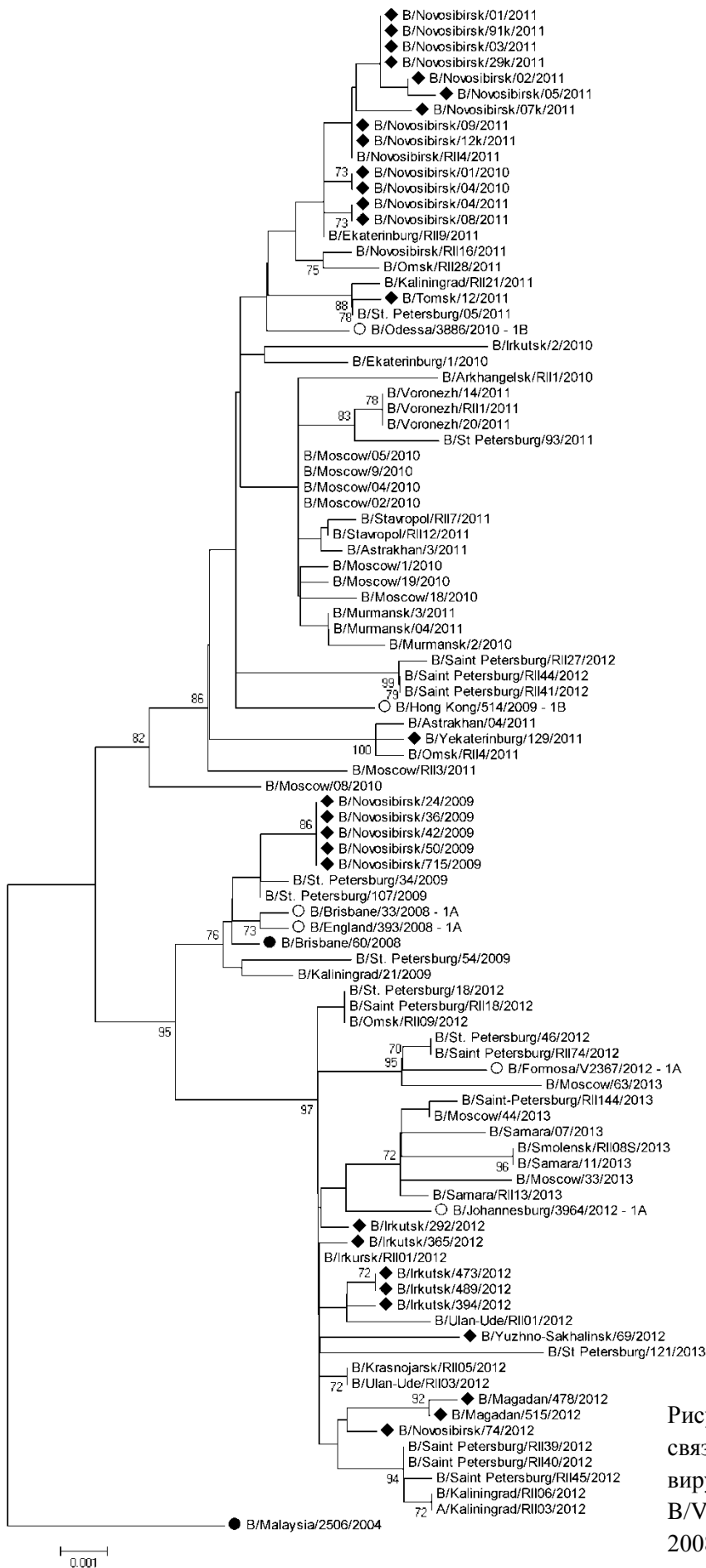


Рисунок 45. Филогенетические связи между НА штаммов вирусов гриппа В линии В/Victoria выделенных в РФ с 2008 по 2013 гг.

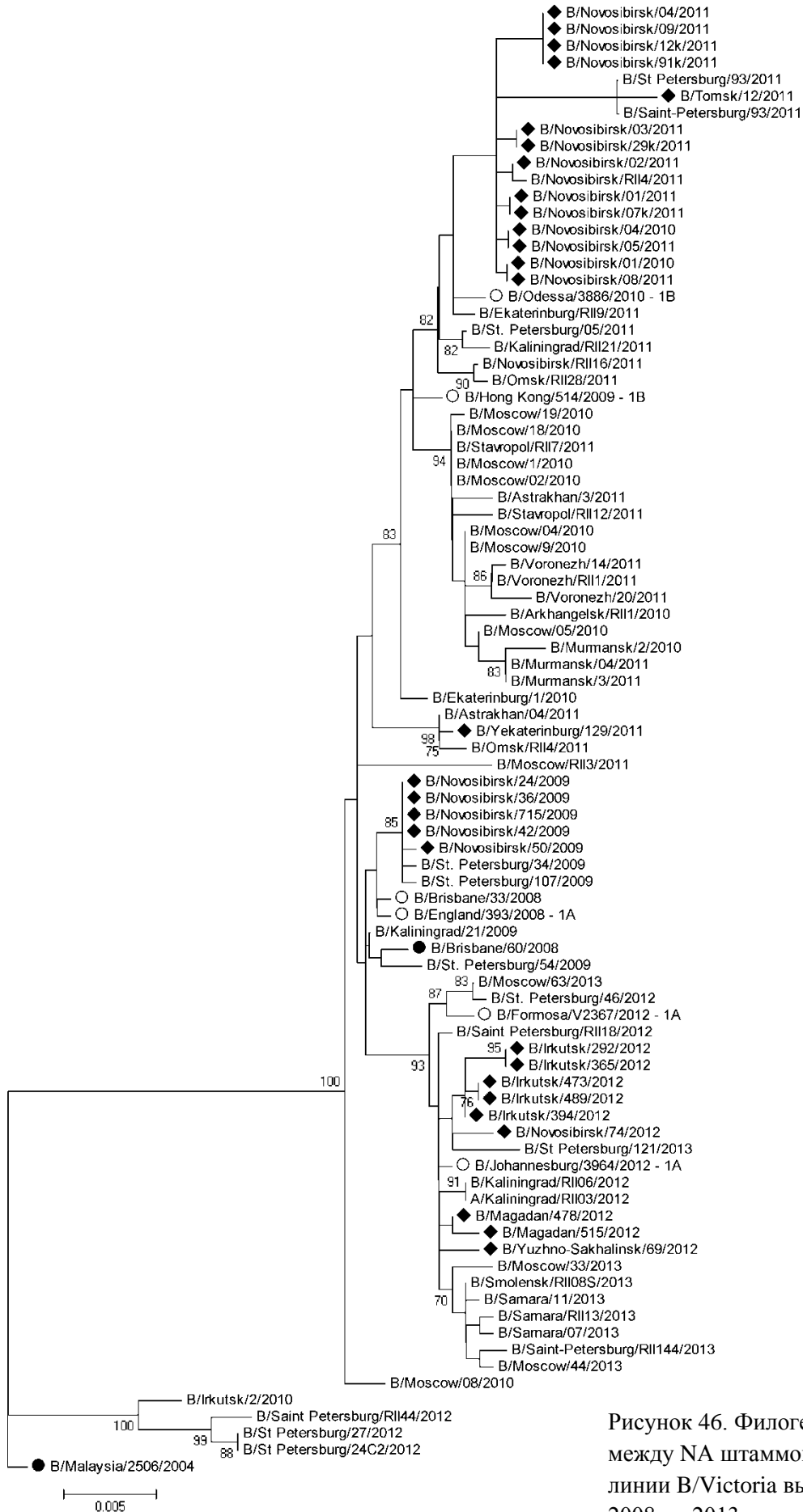


Рисунок 46. Филогенетические связи между NA штаммов вирусов гриппа В линии В/Victoria выделенных в РФ с 2008 по 2013 гг.

С 2011 г. была выявлена совместная циркуляция вирусов гриппа В обеих генетических линий: В/Victoria (рис. 45-46) и В/Yamagata (рис. 47-48), что совпадает с данными, представленными другими исследователями. Штаммы вируса гриппа линии В/Victoria, изолированные в азиатской части РФ и рассмотренные в диссертационной работе, принадлежали к кладе 1А Brisbane/60-подобных штаммов и были филогенетически схожи с другими штаммами, выделенными на территории РФ (большинство – в европейской части страны). Штаммы вируса гриппа генетической линии В/Yamagata, выделенные в РФ в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., принадлежали к кладе 3 (с вакцинным штаммом В/Wisconsin/01/2010) и подразделялись на две филогенетические подгруппы. Первая была сформирована выделенными в азиатской части РФ (Новосибирск и Владивосток) штаммами, филогенетически более близкими к В/Wisconsin/01/2010. Ко второй группе можно отнести штаммы, изолированные в европейской части РФ и штамм В/Omsk/7/2012, который отличался от прочих рассмотренных в этой работе штаммов. Штаммы вируса гриппа В линии В/Yamagata, выделенные в 2012-2013 гг. и рассмотренные в этой работе, были филогенетически близки к штаммам из Москвы и Челябинска. В целом же, российские штаммы линии В/Yamagata 2012-2013 гг., за исключением нескольких штаммов клады 3 (В/Arkhangelsk/72/2013, В/Novgorod/92/2013), принадлежали к кладе 2 (с вакцинным штаммом В/Massachusetts/02/2012).





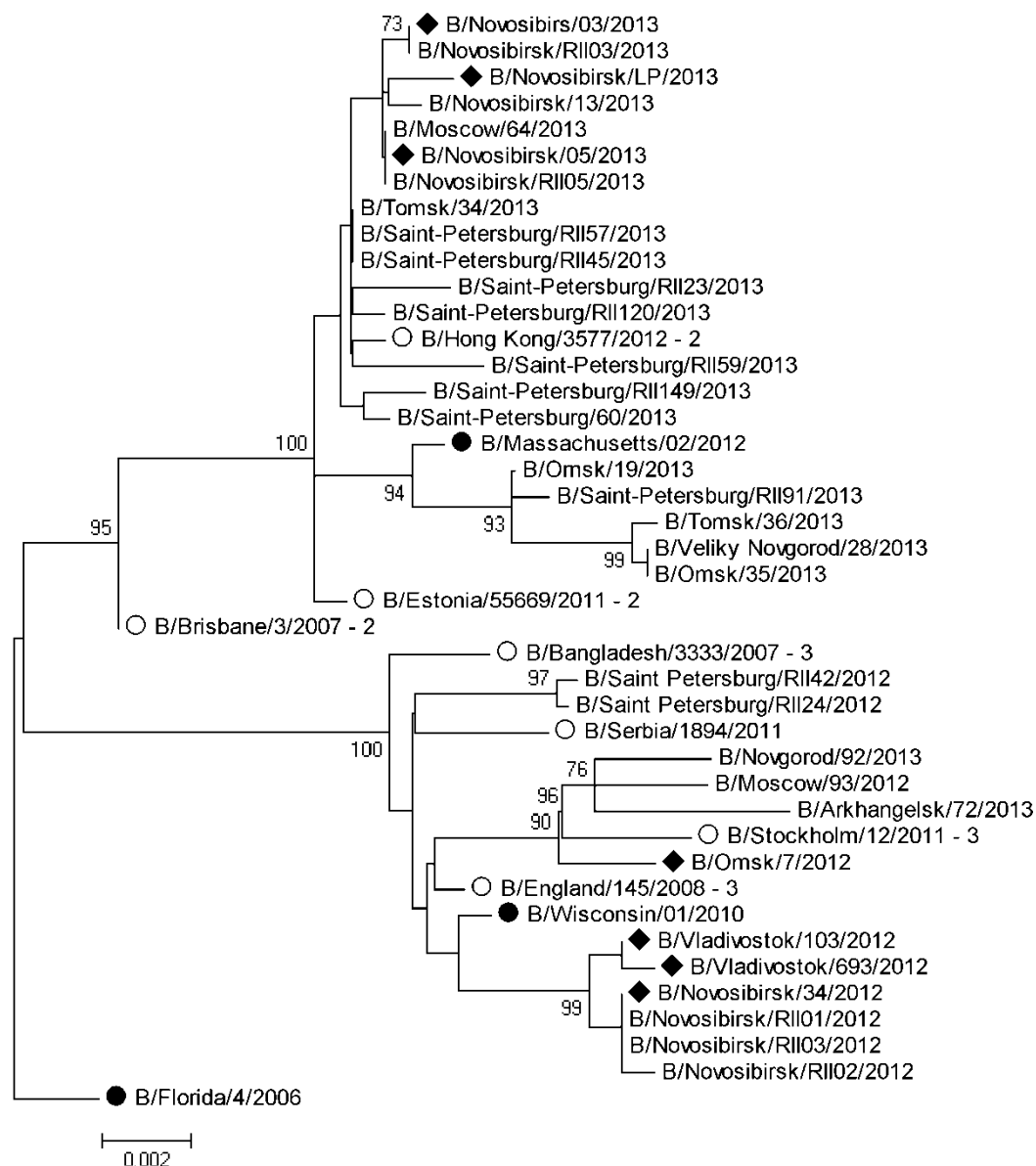


Рисунок 48. Филогенетические связи между NA штаммов вирусов гриппа В линии В/Yamagata выделенных в РФ с 2008 по 2013 гг.

Сиквенсы, представленные в базах данных преимущественно принадлежат штаммам, выделенным в европейской части РФ. При этом, штаммы, изолированные в разных регионах могут отличаться генетически, что коррелирует с результатами филогенетического анализа. Таким образом, полученные в работе результаты дополняют данные о циркуляции вируса гриппа А(Н3N2) на территории РФ за счет анализа генетического разнообразия и изменчивости НА и NA штаммов, изолированных в азиатской части страны.

**ВЫВОДЫ:**

1) Показано, что генетическое разнообразие вирусов гриппа А(Н3N2), циркулировавших в азиатской части РФ с 2008 г. по 2013 г., было представлено в эпидемический сезон 2008-2009 гг. штаммами клады Brisbane/10, в 2010-2011 гг. – штаммами подгруппы 1 клады Perth/16, в 2011-2013 гг. - штаммами подгрупп 3В, 3С и 3С.3 клады Victoria/208.

2) В эпидемический сезон 2011-2012 гг. впервые после сезона 2008 г. была зафиксирована ко-циркуляция двух генетических линий вируса гриппа В: В/Victoria и В/Yamagata. Генетическое разнообразие вирусов гриппа В, циркулировавших в азиатской части РФ с 2008 г. по 2013 г., было представлено в эпидемический сезон 2008-2009 гг. штаммами клады 1А генетической линии В/Victoria, в 2010-2011 гг. – штаммами 1В генетической линии В/Victoria, в 2011-2012 гг. - штаммами клады 1А генетической линии В/Victoria и клады 3 генетической линии В/Yamagata, в 2012-2013 гг. – штаммами клады 2 генетической линии В/Yamagata.

3) Появление и фиксация аминокислотных замен в HA и NA вирусов гриппа А(Н3N2) и В в течение четырех эпидемических сезонов происходило по ограниченному количеству позиций. У вирусов гриппа А(Н3N2) в HA обнаружено 23 таких позиции (17 в антигенных сайтах), а в NA – 19 позиций (5 в антигенных сайтах). У вирусов гриппа В генетической линии В/Victoria – 5 позиций в HA (2 в антигенных сайтах) и 15 в NA. У вирусов гриппа В генетической линии В/Yamagata – 11 позиций в HA (6 в антигенных сайтах) и 11 – в NA.

4) При смене эпидемических сезонов NA исследованных штаммов вируса гриппа типа В характеризовалась большей изменчивостью по сравнению с HA, несмотря на то, что именно гемагглютинин является мишенью системы гуморального иммунного ответа.

5) Структура филогенетических связей исследованных изолятов вируса гриппа указывает на гетерогенность вирусной популяции и свидетельствует о множественных заносах различных вариантов патогена на территорию азиатской части РФ.

6) Штаммы вирусов гриппа А(Н3N2) и В, изолированные в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг., по генетической изменчивости и паттерну аминокислотных замен значительно отличались от штаммов как предыдущего, так и последующих сезонов. Вероятно, эти штаммы, получив распространение в результате снижения разнообразия эпидемических вариантов вирусов гриппа во время пандемии А(Н1N1) pdm09, в постпандемический период оказались неконкурентноспособными и исчезли из циркуляции.

7) В активном центре NA трех штаммов вируса гриппа А(Н3N2) эпидемического сезона 2008-2009 гг. выявлены аминокислотные замены D151G и D151A, известные как

ассоциированные со снижением чувствительности вируса гриппа к ингибитору нейраминидазы – занамивиру. Иных замен, обуславливающих снижение чувствительности вирусов гриппа А(Н3N2) и В к действию ингибиторов нейраминидазы, не обнаружено.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- 1) Грудинин М.П. Генетическое разнообразие и молекулярная эволюция вирусов гриппа А в России в 2006-2012 гг. / М.П. Грудинин, А.Б. Комиссаров, М.М. Писарева и др. // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 6. – С. 37-42.
- 2) Иванова А.В. Антигенные и биологические свойства вирусов гриппа типа В, выделенных в России в 2006 – 2010 годах / А.В. Иванова, Д.М. Даниленко, Т.Г. Лобова и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика - 1 (56). - С. 4-8.
- 3) Каверин Н. В., Антигенная структура гемагглютинина вируса гриппа А / Н.В. Каверин, И.А. Руднева, Т.А. Тимофеева и др. // Вопросы вирусологии. – 2012. – S1. – С. 159-168. С. 148-158.
- 4) Лобова Т. Г. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. / Т. Г. Лобова, А. В. Прокопец, А. Б. Комиссаров и др. // Вопросы вирусологии. – 2012. – 57 (6). – С. 22-26.
- 5) Силуянова Э.В. Эволюционная изменчивость вируса гриппа А(Н3N2) в период 2007-2012 гг. / Э.В. Силуянова, С.В. Альховский, Е.С. Шевченко и др. // Вопросы вирусологии –2013. – Т. 6. – С. 31-35.
- 6) Щелканов М.Ю. Новый субтип вируса гриппа А от летучих мышей и новые задачи эколого-вирусологического мониторинга / М.Ю. Щелканов, Д.К. Львов // Вопросы вирусологии – 2012. – S1. – С. 159-168.
- 7) Abe, Y. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin / Y. Abe, E. Takashita, K. Sugawara et al. // J Virol. - 2004. - 78 (18). - P. 9605-9611.
- 8) Alexander, D.J. An overview of the epidemiology of avian influenza / D.J. Alexander // Vaccine. - 2007. - 25 (30). - P. 5637-5644.
- 9) Ann, J. Molecular and antigenic evolution of human influenza A/H3N2 viruses in Quebec, Canada, 2009-2011 / J. Ann, J. Papenburg, X. Bouhy et al. // J Clin Virol. - 2012. - 53 (1). - P. 88-92.
- 10) Arencibia, A. Genetic drift of hemagglutinin (HA) of influenza A(H3N2) viruses circulating in Cuba between 2011 and 2013 / A. Arencibia, B. Acosta, M. Mune et al. // Infect Genet Evol. - 2014. - 28. - P. 58-61.
- 11) Aytay, S. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin can alter the host range and receptor binding properties of H1 strains of influenza A virus / S. Aytay, I.T. Schulze // J Virol. - 1991. - 65 (6). - P. 3022-3028.

- 12) Baek, Y.H. Molecular characterization and phylogenetic analysis of H3N2 human influenza A viruses in Cheongju, South Korea / Y.H. Baek, J.H. Park, Y.J. Song et al. // *J Microbiol.* - 2009. - 47 (1). - P. 91-100.
- 13) Baltimore, D. Expression of animal virus genomes / D. Baltimore // *Bacteriol Rev.* - 1971. - 35 (3). - P. 235-241.
- 14) Bao, Y. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information / Y. Bao, P. Bolotov, D. Dernovoy et al. // *J Virol.* - 2008. - 82 (2). - P. 596-601.
- 15) Baudin, F. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent / F. Baudin, C. Bach, S. Cusack et al. // *EMBO J.* - 1994. - 13 (13). - P. 3158-3165.
- 16) Baum, L.G. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity / L.G. Baum, J.C. Paulson // *Acta Histochem Suppl.* - 1990. - 40. - P. 35-38.
- 17) Bavagnoli, L. The novel influenza A virus protein PA-X and its naturally deleted variant show different enzymatic properties in comparison to the viral endonuclease PA / L. Bavagnoli, S. Cucuzza, G. Campanini et al. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - 43 (19). - P. 9405-9417.
- 18) Beaton, A.R. Selected host cell capped RNA fragments prime influenza viral RNA transcription in vivo / A.R. Beaton, R.M. Krug // *Nucleic Acids Res.* - 1981. - 9 (17). - P. 4423-4436.
- 19) Betakova, T. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus / T. Betakova, M.V. Nermut, A.J. Hay // *J Gen Virol.* - 1996. - 77 (11). - P. 2689-2694.
- 20) Bouloy, M. Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro / M. Bouloy, S.J. Plotch, R.M. Krug // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1978. - 75 (10). - P. 4886-4890.
- 21) Brassard, D.L. Influenza B virus NB glycoprotein is a component of the virion / D.L. Brassard, G.P. Leser, R.A. Lamb // *Virology.* - 1996. - 220 (2). - P. 350-360.
- 22) Bullough, P.A. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion / P.A. Bullough, F.M. Hughson, J.J. Skehel et al. // *Nature.* - 1994. - 371 (6492). - P. 37-43.
- 23) Burmeister, W.P., R.W. Ruigrok, S. Cusack The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid / W.P. Burmeister, R.W. Ruigrok, S. Cusack // *EMBO J.* - 1992. - 11 (1). - P. 49-56.
- 24) Bush, R.M. Predicting the evolution of human influenza A / R.M. Bush, C.A. Bender, K. Subbarao et al. // *Science.* - 1999. - 286 (5446). - P. 1921-1925.

- 25) Byarugaba, D.K. Ducatez, B. Erima et al. Molecular epidemiology of influenza A/H3N2 viruses circulating in Uganda / D.K. Byarugaba, M.F. Ducatez, B. Erima et al. // *PLoS One*. - 2011. - 6 (11). - P. e27803.
- 26) Cai, J. Prevalence, genetic drift of haemagglutinin, and antiviral resistance of influenza A/H3N2 viruses circulating in Shanghai in children during 2009-2012 / J. Cai, X. Wang, B. Zhao et al. // *J Med Virol*. - 2014. - 86 (6). - P. 1026-1033.
- 27) Calder, L.J. S. Structural organization of a filamentous influenza A virus / L.J. Calder, S. Wasilewski, J.A. Berriman et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2010. - 107 (23). - P. 10685-10690.
- 28) Carr, C.M. A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin / C.M. Carr, P.S. Kim // *Cell*. - 1993. - 73 (4). - P. 823-832.
- 29) Carrat, F. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift / F. Carrat, A. Flahault // *Vaccine*. - 2007. - 25 (39-40). - P. 6852-6862.
- 30) Chare, E.R. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses / E.R. Chare, E.A. Gould, E.C. Holmes // *J Gen Virol*. - 2003. - 84 (Pt 10). - P. 2691-2703.
- 31) Chen, R. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics / R. Chen, E.C. Holmes // *Mol Biol Evol*. - 2006. - 23 (12). - P. 2336-2341.
- 32) Chen, W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death / W. Chen, P.A. Calvo, D. Malide et al. // *Nat Med*. - 2001. - 7 (12). - P. 1306-1312.
- 33) Chiapponi, C. Detection of Influenza D Virus among Swine and Cattle, Italy / C. Chiapponi, S. Faccini, A. De Mattia // *Emerg. Infect. Dis*. - 2016. - 22. - P. 352-354.
- 34) Choppin, P.W. Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits / P.W. Choppin, J.S. Murphy, I. Tamm // *J Exp Med*. - 1960. - 112. - P. 945-952.
- 35) Colgan, D.F. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation / D.F. Colgan, J.L. Manley // *Genes Dev*. - 1997. - 11 (21). - P. 2755-2766.
- 36) Collin, E.A. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. / E.A. Collin, Z. Sheng, Y. Lang et al. // *J. Virol*. - 2015 - 89 - P. 1036-1042.
- 37) Colman, P.M. Structure and diversity of influenza virus neuraminidase / P.M. Colman, C.W. Ward // *Curr Top Microbiol Immunol*. - 1985. - 114. - P. 177-255.
- 38) Colman, P.M. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase / P.M. Colman, J.N. Varghese, W.G. Laver // *Nature*. - 1983. - 303 (5912). - P. 41-44.

- 39) Colman, P.M. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase / P.M. Colman, J.N. Varghese, W.G. Laver // *Nature* - 1983. – 303. P. 41–44.
- 40) Compans, R.W. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus / R.W. Compans, J. Content, P.H. Duesberg // *J Virol.* - 1972. - 10 (4). - P. 795-800.
- 41) Connor, R.J. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates / R.J. Connor, Y. Kawaoka, R.G. Webster et al. // *Virology.* - 1994. - 205 (1). - P. 17-23.
- 42) Couceiro, J.N. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity / J.N. Couceiro, J.C. Paulson, L.G. Baum // *Virus Res.* - 1993. - 29 (2). - P. 155-165.
- 43) Crecelius, D.M. Biological properties of a hemagglutinin mutant of influenza virus selected by host cells / D.M. Crecelius, C.M. Deom, I.T. Schulze // *Virology.* - 1984. - 139 (1). - P. 164-177.
- 44) Dapat, C. Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010 / C. Dapat, Y. Suzuki, M. Kon et al. // *Jpn J Infect Dis.* - 2011. - 64 (3). - P. 237-241.
- 45) Das, K. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus / K. Das, L.C. Ma, R. Xiao et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008. - 105 (35). - P. 13093-13098.
- 46) de Jong, J.C. Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy / J.C. de Jong, A.P. van Nieuwstadt, T.G. Kimman et al. // *Vaccine.* - 1999. - 17 (11-12). - P. 1321-1328.
- 47) de la Luna, S. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs / S. de la Luna, P. Fortes, A. Beloso et al. // *J Virol.* - 1995. - 69 (4). - P. 2427-2433.
- 48) Deom, C.M. Host cell-mediated selection of a mutant influenza A virus that has lost a complex oligosaccharide from the tip of the hemagglutinin / C.M. Deom, A.J. Caton, I.T. Schulze // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1986. - 83 (11). - P. 3771-3775.
- 49) Dias, A. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit / A. Dias, D. Bouvier, T. Crepin et al. // *Nature.* - 2009. - 458 (7240). - P. 914-918.
- 50) Ducatez, M.F. Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014 / M.F. Ducatez, C. Pelletier, G. Meyer. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2015. – 21. – P. 368-371.
- 51) Ebranati, E. Reconstruction of the Evolutionary Dynamics of A(H3N2) Influenza Viruses Circulating in Italy from 2004 to 2012 / E. Ebranati, E. Pariani, A. Piralla et al. // *PLoS One.* - 2015. - 10 (9). - P. 1-14.

- 52) Elderfield, R.A. NB protein does not affect influenza B virus replication in vitro and is not required for replication in or transmission between ferrets / R.A. Elderfield, M. Koutsakos, R. Frise et al. // *J Gen Virol.* - 2016. - 97 (3). - P. 593-601.
- 53) Enami, M. Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus / M. Enami, R. Fukuda, A. Ishihama // *Virology.* - 1985. - 142 (1). - P. 68-77.
- 54) Eshaghi, A. Genetic characterization of seasonal influenza A (H3N2) viruses in Ontario during 2010-2011 influenza season: high prevalence of mutations at antigenic sites / A. Eshaghi, V.R. Duvvuri, A. Li et al. // *Influenza Other Respir Viruses.* - 2014. - 8 (2). - P. 250-257.
- 55) Fantoni, A. Genetic drift of influenza A(H3N2) viruses during two consecutive seasons in 2011-2013 in Corsica, France / A. Fantoni, C. Arena, L. Corrias et al. // *J Med Virol.* - 2014. - 86 (4). - P. 585-591.
- 56) Ferguson, L. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle / L. Ferguson, L. Eckard, W.B. Epperson et al. // *Virology.* - 2015. - 486. - P. 28-34.
- 57) Ferguson, L. Pathogenesis of Influenza D virus in Cattle / L. Ferguson, A.K. Olivier, S. Genova et al // *Journal of Virology.* - 2016. - 90(12). - P. 5636-5642.
- 58) Fischer, W.B. Transmembrane peptide NB of influenza B: a simulation, structure, and conductance study / W.B. Fischer, M. Pitkeathly, B.A. Wallace et al. // *Biochemistry.* - 2000. - 39 (41). - P. 12708-12716.
- 59) Flick, R. Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure / R. Flick, G. Neumann, E. Hoffmann et al. // *RNA.* - 1996. - 2 (10). - P. 1046-1057.
- 60) Fodor, E. The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription / E. Fodor, D.C. Pritlove, G.G. Brownlee // *J Virol.* - 1994. - 68 (6). - P. 4092-4096.
- 61) Fouchier, R.A. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls / R.A. Fouchier, V. Munster, A. Wallensten et al. // *J Virol.* - 2005. - 79 (5). - P. 2814-2822.
- 62) Fujiyoshi, Y. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy / Y. Fujiyoshi, N.P. Kume, K. Sakata et al. // *EMBO J.* - 1994. - 13 (2). - P. 318-326.
- 63) Gallagher, P.J. Glycosylation requirements for intracellular transport and function of the hemagglutinin of influenza virus / P.J. Gallagher, J.M. Henneberry, J.F. Sambrook et al. // *J Virol.* - 1992. - 66 (12). - P. 7136-7145.
- 64) Gambaryan, A.S. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties on H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs / A.S. Gambaryan, V.P. Marinina, A.B. Tuzikov et al. // *Virology.* - 1998. - 247 (2). - P. 170-177.



- 65) Gamblin, S.J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins / S.J. Gamblin, J.J. Skehel // *J Biol Chem.* - 2010. - 285 (37). - P. 28403-28409.
- 66) Garman, E. The Structure, Function, and Inhibition of Influenza Virus Neuraminidase. / E. Garman, G.Laver // In: Fischer W.B. (eds) *Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design. Protein Reviews.* - vol 1. – P. 247-267.
- 67) Garten, R.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans / R.J. Garten, C.T. Davis, C.A. Russell et al. // *Science.* - 2009. - 325 (5937). - P. 197-201.
- 68) Ghendon, Y. Introduction to pandemic influenza through history / Y. Ghendon // *Eur J Epidemiol.* - 1994. - 10 (4). - P. 451-453.
- 69) Gonzalez, S. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates / S. Gonzalez, J. Ortin // *EMBO J.* - 1999. - 18 (13). - P. 3767-3775.
- 70) Gorman, O.T. Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis / O.T. Gorman, W.J. Bean, R.G. Webster // *Curr Top Microbiol Immunol.* - 1992. - 176. - P. 75-97.
- 71) Gottschalk, A. The influenza virus neuraminidase / A. Gottschalk // *Nature.* - 1958. - 181 (4606). - P. 377-378.
- 72) Guilligay, D. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2 / D. Guilligay, F. Tarendeau, P. Resa-Infante et al. // *Nat Struct Mol Biol.* - 2008. - 15 (5). - P. 500-506.
- 73) Gunther, I. A. H1 hemagglutinin of a human influenza A virus with a carbohydrate-modulated receptor binding site and an unusual cleavage site / I. Gunther, B. Glatthaar, G. Doller et al. // *Virus Res.* - 1993. - 27 (2). - P. 147-160.
- 74) Guo, Z. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I / Z. Guo, L.M. Chen, H. Zeng et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* - 2007. - 36 (3). - P. 263-269.
- 75) Hagen, M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity / M. Hagen, T.D. Chung, J.A. Butcher et al. // *J Virol.* - 1994. - 68 (3). - P. 1509-1515.
- 76) Hampson, A.W. Influenza virus antigens and 'antigenic drift' / A.W. Hampson // In C. W. Potter. *Influenza. Perspectives in medical virology.* - 2002. - Amsterdam: Elsevier. - P. 49-85.

- 77) Hatada, E. Control of influenza virus gene expression: quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells / E. Hatada, M. Hasegawa, J. Mukaigawa et al. // *J Biochem.* - 1989. - 105 (4). - P. 537-546.
- 78) Hatta, M. The NB protein of influenza B virus is not necessary for virus replication in vitro / M. Hatta, Y. Kawaoka // *J Virol.* - 2003. - 77 (10). - P. 6050-6054.
- 79) Hause, B.M. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family / B.M. Hause, E.A. Collin, R. Liu et al. // *MBio.* - 2014. - 5 (2). - P. 1-10.
- 80) Hause, B.M. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses / B.M. Hause, M. Ducatez, E.A. Collin et al. // *PLoS Pathog.* - 2013. - 9. - P. 1-11.
- 81) Hay, A.J. The evolution of human influenza viruses / A.J. Hay, V. Gregory, A.R. Douglas et al. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* - 2001. - 356 (1416). - P. 1861-1870.
- 82) Hay, A.J. Transcription of the influenza virus genome / A.J. Hay, B. Lomniczi, A.R. Bellamy et al. // *Virology.* - 1977. - 83 (2). - P. 337-355.
- 83) Hayashi, T. Impact of influenza PA-X on host response / T. Hayashi, C. Chaimayo, T. Takimoto // *Oncotarget.* - 2015. - 6 (23). - P. 19364-19365.
- 84) He, C.Q. Homologous recombination as an evolutionary force in the avian influenza A virus / C.Q. He, Z.X. Xie, G.Z. Han et al. // *Mol Biol Evol.* - 2009. - 26 (1). - P. 177-187.
- 85) Henklein, P. Influenza A virus protein PB1-F2: synthesis and characterization of the biologically active full length protein and related peptides / P. Henklein, K. Bruns, M. Nimtz et al. // *J Pept Sci.* - 2005. - 11 (8). - P. 481-490.
- 86) Horm, S.V. Epidemiological and virological characteristics of influenza viruses circulating in Cambodia from 2009 to 2011 / S.V. Horm, S. Mardy, S. Rith et al. // *PLoS One.* - 2014. - 9 (10). - P. 1-14.
- 87) Huson, D.H. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies / D.H. Huson, D. Bryant // *Mol Biol Evol.* - 2006. - 23 (2). - P. 254-267.
- 88) Huson, D.H. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data / D.H. Huson // *Bioinformatics.* - 1998. - 14 (1). - P. 68-73.
- 89) Hutchinson, E.C. Genome packaging in influenza A virus / E.C. Hutchinson, J.C. von Kirchbach, J.R. Gog et al. // *J Gen Virol.* - 2010. - 91 (Pt 2). - P. 313-328.
- 90) Ito, T. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential / T. Ito, J.N. Couceiro, S. Kelm et al. // *J Virol.* - 1998. - 72 (9). - P. 7367-7373.

- 91) Jagger, B.W. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response / B.W. Jagger, H.M. Wise, J.C. Kash et al. // *Science*. - 2012. - 337 (6091). - P. 199-204.
- 92) Jain, A. Genetic changes in influenza A(H3N2) viruses circulating during 2011 to 2013 in northern India (Lucknow) / A. Jain, T. Dangi, B. Jain et al. // *J Med Virol*. - 2015. - 87 (8). - P. 1268-1275.
- 93) Jiang, W.M. Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China / W.M. Jiang, S.C. Wang, C. Peng // *Virus Genes*. - 2014. - 49. - P. 493-496.
- 94) Jones, I.M. Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2 / I.M. Jones, P.A. Reay, K.L. Philpott // *EMBO J*. - 1986. - 5 (9). - P. 2371-2376.
- 95) Kawaoka, Y. Orthomyxoviridae / Kawaoka Y., N.J. Cox, O. Haller et al. // In C. M. Fauquet et al. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. - 2005. - London: Elsevier Academic Press.
- 96) Khatchikian, D. Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus / D. Khatchikian, M. Orlich, R. Rott // *Nature*. - 1989. - 340 (6229). - P. 156-157.
- 97) Kilbourne, E.D. Influenza pandemics in perspective / E.D. Kilbourne // *JAMA*. - 1977. - 237 (12). - P. 1225-1228.
- 98) Kimura, H. Interspecies transmission of influenza C virus between humans and pigs / H. Kimura, C. Abiko, G. Peng et al. // *Virus Res*. - 1997. - 48 (1). - P. 71-79.
- 99) King, A. *ICTV Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* / ICTV, A. King et al. // - 2012. - Waltham, USA - Elsevier.
- 100) Klenk, H.D. Host cell proteases controlling virus pathogenicity / H.D. Klenk, W. Garten // *Trends Microbiol*. - 1994. - 2 (2). - P. 39-43.
- 101) Klumpp, K. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure / K. Klumpp, R.W. Ruigrok, F. Baudin // *EMBO J*. - 1997. - 16 (6). - P. 1248-1257.
- 102) Kossyvakis, A. Challenges in antigenic characterization of circulating influenza A(H3N2) viruses during the 2011-2012 influenza season: an ongoing problem? / A. Kossyvakis, V. Pogka, A. Melidou et al. // *J Clin Microbiol*. - 2015. - 53 (5). - P. 1493-1499.

- 103) Krug, R.M. Expression and replication of the influenza virus genome / R.M. Krug, F.V. Alonso-Caplen, I. Julkunen et al. // In R. M. Krug. The influenza viruses. - 1989. - New York: Plenum.
- 104) Lamb, R.A. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides / R.A. Lamb, P.W. Choppin // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1979. - 76 (10). - P. 4908-4912.
- 105) Lamb, R.A. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome / R.A. Lamb, P.W. Choppin, R.M. Chanock et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1980. - 77 (4). - P. 1857-1861.
- 106) Lamb, R.A. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication / R.A. Lamb // In B. N. Fields et al. Fields virology. - 2001. - Philadelphia: Lippincott-Raven. - P. P. 1487–1531.
- 107) Lee, K.H. The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens / K.H. Lee, B.L. Seong // J Gen Virol. - 1998. - 79 ( Pt 8). - P. 1923-1934.
- 108) Lee, M.K. A single-nucleotide natural variation (U4 to C4) in an influenza A virus promoter exhibits a large structural change: implications for differential viral RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase / M.K. Lee, S.H. Bae, C.J. Park et al. // Nucleic Acids Res. - 2003. - 31 (4). - P. 1216-1223.
- 109) Lees, W.D. A computational analysis of the antigenic properties of haemagglutinin in influenza A H3N2 / W.D. Lees, D.S. Moss, A.J. Shepherd // Bioinformatics. - 2010. - 26 (11). - P. 1403-1408.
- 110) Li, M.L. RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites / M.L. Li, B.C. Ramirez, R.M. Krug // EMBO J. - 1998. - 17 (19). - P. 5844-5852.
- 111) Li, S. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus / S. Li, J. Schulman, S. Itamura et al. // J Virol. - 1993. - 67 (11). - P. 6667-6673.
- 112) Lindstrom, S.E. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events / S.E. Lindstrom, N.J. Cox, A. Klimov // Virology. - 2004. - 328 (1). - P. 101-119.
- 113) Ludwig, S. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? / S. Ludwig, L. Stitz, O. Planz et al. // Virology. - 1995. - 212 (2). - P. 555-561.

- 114) Lugovtsev, V.Y. Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of hemagglutinin / V.Y. Lugovtsev, G.M. Vodeiko, C.M. Strupczewski et al. // *Virology*. - 2007. - 365 (2). - P. 315-323.
- 115) Manuguerra, J.C. Evidence for evolutionary stasis and genetic drift by genetic analysis of two equine influenza H3 viruses isolated in France / J.C. Manuguerra, S. Zientara, C. Sailleau et al. // *Vet Microbiol.* - 2000. - 74 (1-2). - P. 59-70.
- 116) Martin, K. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import / K. Martin, A. Helenius // *Cell*. - 1991. - 67 (1). - P. 117-130.
- 117) Martin, K. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus / K. Martin, A. Helenius // *J Virol.* - 1991. - 65 (1). - P. 232-244.
- 118) Martin-Benito, J. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle / J. Martin-Benito, E. Area, J. Ortega et al. // *EMBO Rep.* - 2001. - 2 (4). - P. 313-317.
- 119) Matlin, K.S. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line / K.S. Matlin, H. Reggio, A. Helenius et al. // *J Cell Biol.* - 1981. - 91 (3 Pt 1). - P. 601-613.
- 120) Matrosovich, M. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals / M. Matrosovich, A. Tuzikov, N. Bovin et al. // *J Virol.* - 2000. - 74 (18). - P. 8502-8512.
- 121) Matrosovich, M.N. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site / M.N. Matrosovich, A.S. Gambaryan, S. Teneberg et al. // *Virology*. - 1997. - 233 (1). - P. 224-234.
- 122) Matrosovich, M.N. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium / M.N. Matrosovich, T.Y. Matrosovich, T. Gray et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2004. - 101 (13). - P. 4620-4624.
- 123) Matrosovich, M.N. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium / M.N. Matrosovich, T.Y. Matrosovich, T. Gray et al. // *J Virol.* - 2004. - 78 (22). - P. 12665-12667.
- 124) Matsuzaki, Y. Clinical features of influenza C virus infection in children / Y. Matsuzaki, N. Katsushima, Y. Nagai et al. // *Journal of Infectious Diseases.* - 2006. - 193 (9). - P. 1229-1235.
- 125) McCullers, J.A. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature / J.A. McCullers, G.C. Wang, S. He et al. // *J Virol.* - 1999. - 73 (9). - P. 7343-7348.

- 126) McHardy, A.C. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus / A.C. McHardy, B. Adams // *PLoS Pathog.* - 2009. - 5 (10). - P. 1-6.
- 127) Melen, K. Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein / K. Melen, R. Fagerlund, J. Franke et al. // *J Biol Chem.* - 2003. - 278 (30). - P. 28193-28200.
- 128) Mibayashi, M. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus / M. Mibayashi, L. Martinez-Sobrido, Y.M. Loo et al. // *J Virol.* - 2007. - 81 (2). - P. 514-524.
- 129) Min, J.Y. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis / J.Y. Min, S. Li, G.C. Sen et al. // *Virology.* - 2007. - 363 (1). - P. 236-243.
- 130) Mir-Shekari, S.Y. The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells. A site-specific study / S.Y. Mir-Shekari, D.A. Ashford, D.J. Harvey et al. // *J Biol Chem.* - 1997. - 272 (7). - P. 4027-4036.
- 131) Mishin, V.P. The effect of the MDCK cell selected neuraminidase D151G mutation on the drug susceptibility assessment of influenza A(H3N2) viruses / V.P. Mishin, K. Sleeman, M. Levine et al. // *Antiviral Res.* 2014. – 101. – P. 93–96
- 132) Mitra, N. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus / N. Mitra, N. Cernicchiaro, S. Torres // *J. Gen. Virol.* - 2016. - 97(8). – P. 1771-1784.
- 133) Mohr, P.G. The neuraminidases of MDCK grown human influenza A(H3N2) viruses isolated since 1994 can demonstrate receptor binding / P.G. Mohr, Y.M. Deng, J.L. McKimm-Breschkin // *Virol. J.* – 2015. - 12(67). – P. 1-11.
- 134) Morens, D.M. The persistent legacy of the 1918 influenza virus / D.M. Morens, J.K. Taubenberger, A.S. Fauci // *N Engl J Med.* - 2009. - 361 (3). - P. 225-229.
- 135) Murakami, S. Influenza D Virus Infection in Herd of Cattle, Japan / S. Murakami, M. Endoh, T. Kobayashi // *Emerg. Infect. Dis.* - 2016. – 22. – P. 1517-1519.
- 136) Muramoto, Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA / Y. Muramoto, T. Noda, E. Kawakami et al. // *J Virol.* - 2013. - 87 (5). - P. 2455-2462.
- 137) Nakagawa, N. Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season / N. Nakagawa, R. Kubota, A. Maeda et al. // *J Clin Microbiol.* - 2004. - 42 (7). - P. 3295-3297.

- 138) Nakagawa, Y. The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome / Y. Nakagawa, K. Oda, S. Nakada // *J Virol.* - 1996. - 70 (9). - P. 6390-6394.
- 139) Nayak, D.P. Influenza virus morphogenesis and budding / D.P. Nayak, R.A. Balogun, H. Yamada et al. // *Virus Res.* - 2009. - 143 (2). - P. 147-161.
- 140) Nemeroff, M.E. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs / M.E. Nemeroff, S.M. Barabino, Y. Li et al. // *Mol Cell.* - 1998. - 1 (7). - P. 991-1000.
- 141) Ng, T.F. Metagenomics and Case-Control Study To Identify Viruses Associated with Bovine Respiratory Disease / T.F. Ng, N.O. Kondov, X. Deng // *Journal of Virology.* - 2015. - 89. - P. 5340-5349.
- 142) Nguyen, H.T. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods / H.T. Nguyen, A.M. Fry, L.V. Gubareva // *Antivir Ther.* - 2012. - 17 (1 Pt B). - P. 159-173.
- 143) Noah, D.L. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs / D.L. Noah, K.Y. Twu, R.M. Krug // *Virology.* - 2003. - 307 (2). - P. 386-395.
- 144) Noda, T. Native morphology of influenza virions / T. Noda // *Front Microbiol.* - 2011. - 2. - P. 269.
- 145) Noda, T. Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions / T. Noda, Y. Kawaoka // *Rev Med Virol.* - 2010. - 20 (6). - P. 380-391.
- 146) Ohuchi, M. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety / M. Ohuchi, R. Ohuchi, A. Feldmann et al. // *J Virol.* - 1997. - 71 (11). - P. 8377-8384.
- 147) O'Neill, R.E. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins / R.E. O'Neill, J. Talon, P. Palese // *EMBO J.* - 1998. - 17 (1). - P. 288-296.
- 148) Opitz, B. IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein / B. Opitz, A. Rejaibi, B. Dauber et al. // *Cell Microbiol.* - 2007. - 9 (4). - P. 930-938.
- 149) Orlich, M. Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus / M. Orlich, H. Gottwald, R. Rott // *Virology.* - 1994. - 204 (1). - P. 462-465.

- 150) Osterhaus, A.D. Influenza B virus in seals / A.D. Osterhaus, G.F. Rimmelzwaan, B.E. Martina et al. // *Science*. - 2000. - 288 (5468). - P. 1051-1053.
- 151) Palese, P. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase / P. Palese, K. Tobita, M. Ueda et al. // *Virology*. - 1974. - 61 (2). - P. 397-410.
- 152) Pariani, 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 / E. Pariani, A. Amendola, E. Ebranati et al. // *Infect Genet Evol*. - 2013. - 13. - P. 252-260.
- 153) Pariani, E. Surveillance of influenza viruses in the post-pandemic era (2010-2012) in Northern Italy / E. Pariani, A. Amendola, A. Ranghiero et al. // *Hum Vaccin Immunother*. - 2013. - 9 (3). - P. 657-666.
- 154) Paterson, D. Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP) / D. Paterson, E. Fodor // *PLoS Pathog*. - 2012. - 8 (12). - P. 1-8.
- 155) Perez, D.R. The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo / D.R. Perez, R.O. Donis // *Virology*. - 1998. - 249 (1). - P. 52-61.
- 156) Perez-Padilla, R. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico / R. Perez-Padilla, D. de la Rosa-Zamboni, S. Ponce de Leon et al. // *N Engl J Med*. - 2009. - 361 (7). - P. 680-689.
- 157) Pinto, L.H. Influenza virus M2 protein has ion channel activity / L.H. Pinto, L.J. Holsinger, R.A. Lamb // *Cell*. - 1992. - 69 (3). - P. 517-528.
- 158) Plotch, S.J. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription / S.J. Plotch, M. Bouloy, I. Ulmanen et al. // *Cell*. - 1981. - 23 (3). - P. 847-858.
- 159) Pons, M.W. Isolation of influenza virus ribonucleoprotein from infected cells. Demonstration of the presence of negative-stranded RNA in viral RNP / M.W. Pons // *Virology*. - 1971. - 46 (1). - P. 149-160.
- 160) Rao, P. Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis / P. Rao, W. Yuan, R.M. Krug // *EMBO J*. - 2003. - 22 (5). - P. 1188-1198.
- 161) Reid, A.H. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma / A.H. Reid, J.K. Taubenberger // *J Gen Virol*. - 2003. - 84 (Pt 9). - P. 2285-2292.
- 162) Rogers, G.N. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin / G.N. Rogers, J.C. Paulson // *Virology*. - 1983. - 127 (2). - P. 361-373.



- 163) Rossman, J.S. Influenza virus assembly and budding / J.S. Rossman, R.A. Lamb // *Virology*. - 2011. - 411 (2). - P. 229-236.
- 164) Ruigrok, R.W. Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure / R.W. Ruigrok, L.J. Calder, S.A. Wharton // *Virology*. - 1989. - 173 (1). - P. 311-316.
- 165) Rust, M.J. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry / M.J. Rust, M. Lakadamyali, F. Zhang et al. // *Nat Struct Mol Biol*. - 2004. - 11 (6). - P. 567-573.
- 166) Saito, T. Loss of glycosylation at Asn144 alters the substrate preference of the N8 influenza A virus neuraminidase / T. Saito, K. Kawano // *J Vet Med Sci*. - 1997. - 59 (10). - P. 923-926.
- 167) Saito, T. Phylogenetic analysis of the N8 neuraminidase gene of influenza A viruses / T. Saito, Y. Kawaoka, R.G. Webster // *Virology*. - 1993. - 193 (2). - P. 868-876.
- 168) Samson, M. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors / M. Samson, A. Pizzorno, Y. Abed et al. // *Antiviral Res*. - 2013. - 98 (2). - P. 174-185.
- 169) Scholtissek, C. Influenza A viruses with noncleaved hemagglutinin are not internalized after adsorption. Brief report / C. Scholtissek // *Arch Virol*. - 1986. - 90 (1-2). - P. 159-163.
- 170) Shao, T.J. Progressive antigenic drift and phylogeny of human influenza A(H3N2) virus over five consecutive seasons (2009-2013) in Hangzhou, China / T.J. Shao, J. Li, X.F. Yu et al. // *Int J Infect Dis*. - 2014. - 29. - P. 190-193.
- 171) Shapiro, G.I. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs / G.I. Shapiro, T. Gurney, Jr., R.M. Krug // *J Virol*. - 1987. - 61 (3). - P. 764-773.
- 172) Shaw, M.W. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase / M.W. Shaw, P.W. Choppin, R.A. Lamb // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1983. - 80 (16). - P. 4879-4883.
- 173) Shaw, M.W. A specific sub-set of host-cell mRNAs prime influenza virus mRNA synthesis / M.W. Shaw, R.A. Lamb // *Virus Res*. - 1984. - 1 (6). - P. 455-467.
- 174) Sheu, T. G. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008 / T.G. Sheu, V.M. Deyde, M. Okomo-Adhiambo et al. // *Antimicrob Agents Chemother*. - 2008. - 52(9). - P. 3284-3292.
- 175) Shichinohe, S. Selection of H3 avian influenza viruses with SA $\alpha$ 2,6Gal receptor specificity in pigs / S. Shichinohe, M. Okamatsu, Y. Sakoda et al. // *Virology*. - 2013. - 444 (1-2). - P. 404-408.

- 176) Shih, A.C. Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution / A.C. Shih, T.C. Hsiao, M.S. Ho et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2007. - 104 (15). - P. 6283-6288.
- 177) Shinya, K. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway / K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada et al. // *Nature*. - 2006. - 440 (7083). - P. 435-436.
- 178) Shtyrya, Y.A. Influenza virus neuraminidase: structure and function / Y.A. Shtyrya, L.V. Mochalova, N.V. Bovin // *Acta Naturae*. - 2009. - 1 (2). - P. 26-32.
- 179) Skehel, J.J. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody / J.J. Skehel, D.J. Stevens, R.S. Daniels et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1984. - 81 (6). - P. 1779-1783.
- 180) Skehel, J.J. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin / J.J. Skehel, D.C. Wiley // *Annu Rev Biochem*. - 2000. - 69. - P. 531-569.
- 181) Smith, D.J. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus / D.J. Smith, A.S. Lapedes, J.C. de Jong et al. // *Science*. - 2004. - 305 (5682). - P. 371-376.
- 182) Smith, G.J. Dating the emergence of pandemic influenza viruses / G.J. Smith, J. Bahl, D. Vijaykrishna et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2009. - 106 (28). - P. 11709-11712.
- 183) Smith, G.L. Replication of the influenza virus genome / G.L. Smith, A.J. Hay // *Virology*. - 1982. - 118 (1). - P. 96-108.
- 184) Smith, G.L. Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses / G.L. Smith, J.Z. Levin, P. Palese et al. // *Virology*. - 1987. - 160 (2). - P. 336-345.
- 185) Sreenivasan, C. Replication and Transmission of the Novel Bovine Influenza D Virus in a Guinea Pig Model / C. Sreenivasan, M. Thomas, Z. Sheng et al. // *J. Virol*. - 2015. - 89. - P. 11990-12001.
- 186) Steinhauer, D.A. Structure and function of the hemagglutinin / D.A. Steinhauer, S.A. Wharton // In K. Nicholson et al. *Textbook of Influenza*. - 1998. - Oxford: Blackwell Science. - P.
- 187) Stevens, J. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus / J. Stevens, A.L. Corper, C.F. Basler et al. // *Science*. - 2004. - 303 (5665). - P. 1866-1870.
- 188) Suarez, D.L. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile / D.L. Suarez, D.A. Senne, J. Banks et al. // *Emerg Infect Dis*. - 2004. - 10 (4). - P. 693-699.

- 189) Sunstrom, N.A. Ion channels formed by NB, an influenza B virus protein / N.A. Sunstrom, L.S. Premkumar, A. Premkumar et al. // *J Membr Biol.* - 1996. - 150 (2). - P. 127-132.
- 190) Taubenberger, J.K. Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1 / J.K. Taubenberger, D.M. Morens // *Rev Sci Tech.* - 2009. - 28 (1). - P. 187-202.
- 191) Tong, S. New world bats harbor diverse influenza A viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al. // *PLoS Pathog.* - 2013. - 9 (10). - P. 1-12.
- 192) Treanor, J. Influenza vaccine - outmaneuvering antigenic shift and drift / J. Treanor // *N Engl J Med.* - 2004. - 350 (3). - P. 218-220.
- 193) Tumova, B. Antigenic Relationship between Influenza A Viruses of Human and Animal Origin / B. Tumova, H.G. Pereira // *Bulletin of the World Health Organization.* - 1968. - 38 (3). - P. 415-420.
- 194) Ulmanen, I. Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription / I. Ulmanen, B.A. Broni, R.M. Krug // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1981. - 78 (12). - P. 7355-7359.
- 195) Varghese, J.N. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution / J.N. Varghese, W.G. Laver, P.M. Colman // *Nature.* - 1983. - 303 (5912). - P. 35-40.
- 196) Varki, A. *Essentials of Glycobiology* / A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko et al. // - 2009. - New York: - Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 197) Verhoeven, M. Complete nucleotide sequence of the influenza B/Singapore/222/79 virus hemagglutinin gene and comparison with the B/Lee/40 hemagglutinin / M. Verhoeven, L. Van Rompuy, W.M. Jou et al. // *Nucleic Acids Res.* - 1983. - 11 (14). - P. 4703-4712.
- 198) *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Online (10th) Report of the ICTV [Электронный ресурс]* / ICTV. - 2017. - Режим доступа: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/).
- 199) Wang, Q. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin / Q. Wang, F. Cheng, M. Lu et al. // *J Virol.* - 2008. - 82 (6). - P. 3011-3020.
- 200) Watanabe, K. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein / K. Watanabe, H. Handa, K. Mizumoto et al. // *J Virol.* - 1996. - 70 (1). - P. 241-247.
- 201) Webster, R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster, W.J. Bean, O.T. Gorman et al. // *Microbiol Rev.* - 1992. - 56 (1). - P. 152-179.
- 202) Webster, R.G. H5N1 outbreaks and enzootic influenza / R.G. Webster, M. Peiris, H. Chen et al. // *Emerg Infect Dis.* - 2006. - 12 (1). - P. 3-8.

203) Wedde, M. Evolution of the hemagglutinin expressed by human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses circulating between 2008-2009 and 2013-2014 in Germany / M. Wedde, B. Biere, T. Wolff et al. // Int J Med Microbiol. - 2015. - 305 (7). - P. 762-775.

204) White, S.K. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle / S.K. White, W. Ma, C.J. McDaniel et al. // Journal of Clinical Virology - 2016. – 81. – P. 31- 33.

205) WHO recommendations on the composition of influenza virus vaccines [Электронный ресурс] / WHO. -Режим доступа: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>.

206) WHO Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza / WHO. - 2011.

207) WHO Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013–2014 northern hemisphere influenza season / WHO. - 2013.

208) WHO Report of WHO Influenza Centre London, February 2009 / WHO. - 2009.

209) WHO Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere, 2009 / WHO. - 2008.

210) WHO Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere, 14th - 18th February 2010 / WHO. - 2010.

211) WHO Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere, 14th - 17th February 2011 / WHO. - 2011.

212) WHO Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere, 20th – 22nd February 2012 / WHO. - 2012.

213) WHO Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2013/14, 18th – 20th February 2013 / WHO. - 2013.

214) WHO Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2014, 23rd – 25th September 2013 / WHO. - 2013.

215) WHO Report prepared for WHO annual consultation on the composition of Influenza vaccine for the Southern hemisphere, September 2008. / WHO. - 2008.

216) Wiley, D.C. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation / D.C. Wiley, I.A. Wilson, J.J. Skehel // Nature. - 1981. - 289 (5796). - P. 373-378.

- 217) Wiley, D.C. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus / D.C. Wiley, J.J. Skehel // *Annu Rev Biochem.* - 1987. - 56. - P. 365-394.
- 218) Williams, M.A. Effect of mutations and deletions in a bicistronic mRNA on the synthesis of influenza B virus NB and NA glycoproteins / M.A. Williams, R.A. Lamb // *J Virol.* - 1989. - 63 (1). - P. 28-35.
- 219) Williams, S.P. Analysis of the restriction to the growth of nonegg-adapted human influenza virus in eggs / S.P. Williams, J.S. Robertson // *Virology.* - 1993. - 196 (2). - P. 660-665.
- 220) Wise, H.M. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA / H.M. Wise, A. Foeglein, J. Sun et al. // *J Virol.* - 2009. - 83 (16). - P. 8021-8031.
- 221) Wise, H.M. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain / H.M. Wise, E.C. Hutchinson, B.W. Jagger et al. // *PLoS Pathog.* - 2012. - 8 (11). - P. 1-14.
- 222) Wright, P.F. Orthomyxoviruses / P.F. Wright, G. Neumann, Y. Kawaoka // In D. M. Knipe et al. *Fields Virology.* - 2007. - Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. - P.
- 223) Wu, Y. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11 / Y. Wu, Y. Wu, B. Tefsen et al. // *Trends Microbiol.* - 2014. - 22 (4). - P. 183-191.
- 224) Yamayoshi, S. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus / S. Yamayoshi, M. Watanabe, H. Goto et al. // *J Virol.* - 2015. - 90 (1). - P. 444-456.
- 225) Yuan, P. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site / P. Yuan, M. Bartlam, Z. Lou et al. // *Nature.* - 2009. - 458 (7240). - P. 909-913.
- 226) Zaraket, H. Full Genome Characterization of Human Influenza A/H3N2 Isolates from Asian Countries Reveals a Rare Amantadine Resistance-Confering Mutation and Novel PB1-F2 Polymorphisms / H. Zaraket, H. Kondo, A. Hibino et al. // *Front Microbiol.* - 2016. - 7(262). - P. 1-14.
- 227) Zebedee, S.L. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions / S.L. Zebedee, R.A. Lamb // *J Virol.* - 1988. - 62 (8). - P. 2762-2772.
- 228) Zheng, W. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex / W. Zheng, Y.J. Tao // *FEBS Lett.* - 2013. - 587 (8). - P. 1206-1214.

Приложение 1. Справки о принятии штаммов на патентное депонирование в Коллекцию микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

 **ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 29.12.2011 № 03.15/4655

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Коллекция микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

вирус гриппа штамм А/Novosibirsk/76k/2011 (H3N2)

(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурыманов А.Г., Ильичева Т.Н.,  
Соболев И. А., Сулопаров И.М., Алексеев А.Ю.,  
Золотых С.И., Шестопапов А.М.  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.,  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».  
Тел./Факс.(383) 336-75-40

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-567**

Генеральный директор



А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630059 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 25.10.2012 № 03.15/3484

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм А/Novosibirsk/13/2012 (H3N2)  
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурьманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
Соболев И.А.,<sup>1</sup> Шестопалов А.М.,<sup>1</sup> Иванова Е.В.,<sup>2</sup>  
Иванова Л.К.<sup>2</sup>  
1. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, Новосибирская обл.,  
р.п. Кольцово, тел./факс: (383) 336-75-40.  
2. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской  
области», 630099, Новосибирская обл., г. Новосибирск, ул.  
Фрунзе, д. 84,  
тел./факс: (383) 224-58-38

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
630559, р.п. Кольцово., Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-603**

Генеральный директор



А.Н. Сергеев

Исп.: Бульчев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 26.12.2012 № 0315/4386

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм А/Novosibirsk/22/2012 (H3N2)  
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурыманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
Соболев И.А.,<sup>1</sup> Шестопалов А.М.,<sup>1</sup> Иванова Е.В.,<sup>2</sup>  
Иванова Л.К.<sup>2</sup>

1. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, Новосибирская обл.,  
р.п. Кольцово, тел./факс: (383) 336-75-40.

2. ФБУЗ «ЦГиЭ в Новосибирской области», 630099, Новосибирская  
обл., г.Новосибирск, ул.Фрунзе, д. 84, тел.факс: (383) 224-58-38

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"  
630559, р.п. Кольцово,  
Новосибирская обл.

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-590**

Генеральный директор



*(Handwritten signature)*

А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

 **ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 14.08.2012 № 03.15/2756

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

вирус гриппа штамм A/Novosibirsk/23k/2012(H3N2)  
(название штамма и вида микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А., Шестопалов А.М.


ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Тел./Факс: (383) 336-75-40

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-581**

Генеральный директор



 А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**  
**«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 26.12.2012 № 03.15/4387

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм А/Novosibirsk/26k/2012 (H3N2)  
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурыманов А.Г., Ильичева Т.Н.,  
Соболев И.А., Шестопалов А.М.

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"  
630559, р.п. Кольцово,  
Новосибирская обл., тел. (383) 336-75-40

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"  
630559, р.п. Кольцово,  
Новосибирская обл.

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: V-589

Генеральный директор



*Handwritten signature*

А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 26.12.2012 № 03.15/4388

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм A/Novosibirsk/59/2012 (H3N2)

(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурыманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
Соболев И.А.,<sup>1</sup> Шестопапов А.М.,<sup>1</sup> Иванова Е.В.,<sup>2</sup>  
Иванова Л.К.<sup>2</sup>

1. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, Новосибирская обл.,  
р.п. Кольцово, тел./факс: (383) 336-75-40.

2. ФБУЗ «ЦГиЭ в Новосибирской области», 630099, Новосибирская  
обл., г.Новосибирск, ул.Фрунзе, д. 84, тел.факс: (383) 224-58-38

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"  
630559, р.п. Кольцово,  
Новосибирская обл.

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-591**

Генеральный директор



*(Handwritten signature)*

А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**



**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru <http://www.vector.nsc.ru> ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 14.08.2012 № 03.15/2753

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

вирус гриппа штамм A/Vladivostok/59/2012(H3N2)

(название штамма и вида микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А., Шестопалов А.М., Яровенко Г.М.<sup>1</sup>, Гореликов В.Н.<sup>1</sup>, Кожан В.Н.<sup>1</sup>, Баранов В.Н.<sup>1</sup>

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Тел./Факс: (383) 336-75-40

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»<sup>1</sup>

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-578**

Генеральный директор



*А.Н. Сергеев*  
А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

 ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 14.08 2012 № 03 15/2254

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

вирус гриппа штамм A/Vladivostok/81/2012(H3N2)  
(название штамма и вида микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А.,  
Шестопалов А.М., Яровенко Г.М.<sup>1</sup>, Гореликов В.Н.<sup>1</sup>, Кожан В.Н.<sup>1</sup>,  
Баранов В.Н.<sup>1</sup>

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Тел./Факс: (383) 336-75-40

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»<sup>1</sup>

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-579**

Генеральный директор



 А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 14.08.2012 № 03.15/2755

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

вирус гриппа штамм A/Vladivostok/99/2012(H3N2)  
(название штамма и вида микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А., Шестопалов А.М., Яровенко Г.М.<sup>1</sup>, Гореликов В.Н.<sup>1</sup>, Кожан В.Н.<sup>1</sup>, Баранов В.Н.<sup>1</sup>

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Тел./Факс: (383) 336-75-40

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»<sup>1</sup>

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-580**

Генеральный директор



*А.Н. Сергеев* А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**  
**«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
 E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 13.08.2012 № 03.15/2739

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
 микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм А/Krasnoyarsk/10/2012(H3N2)  
 (название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурыманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А., Шестопалов А.М.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
 Тел./Факс: (383) 336-75-40

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
 (организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-588**

Генеральный директор



*А.Н. Сергеев*  
 А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
 Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

 **ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 14.08.2012 № 03.15/2757

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм А/Тюшети/03/2012(H3N2)  
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А., Шестопапов А.М.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Тел./Факс: (383) 336-75-40

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-587**

Генеральный директор



 А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**  
**«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
 E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 05.04.2013 № 01.06/1150

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
 микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм А/Novosibirsk/02/2013 (H3N2)  
 (название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурьманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
 Соболев И.А.,<sup>1</sup> Рыжиков А.Б.,<sup>1</sup> Иванова Е.В.,<sup>2</sup> Иванова Л.К.<sup>2</sup>  
 1. ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" 630559, р.п. Кольцово,  
 Новосибирская обл., тел. (383) 336-60-10  
 2. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в  
 Новосибирской области», 630099, ул. Фрунзе, д. 84,  
 г. Новосибирск, тел./факс: (383) 224-58-38

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"  
 630559, р.п. Кольцово,  
 Новосибирская обл.

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-627**

Генеральный директор



А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
 Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**  
**«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
 E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 05.04.2013 № 03/15/1152

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
 микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций,  
 риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм В/Novosibirsk/74/2012  
 (название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурыманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
 Соболев И.А.,<sup>1</sup> Рыжиков А.Б.,<sup>1</sup> Иванова Е.В.,<sup>2</sup> Иванова Л.К.<sup>2</sup>  
 1. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» 630559, р.п. Кольцово,  
 Новосибирская обл., тел. (383) 363-60-10  
 2. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в  
 Новосибирской области», 630099, ул. Фрунзе, д. 84  
 г. Новосибирск, тел./факс: (383) 224-58-38

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
 630559, р.п. Кольцово,  
 Новосибирская обл.

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-629**

Генеральный директор



А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
 Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 25.10.2012 № 03.15/3479

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм V/Irkutsk/01/2012  
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
Соболев И.А.,<sup>1</sup> Шестопапов А.М.,<sup>1</sup> Верховина М.М.,<sup>2</sup>  
Казанова В.Б.<sup>2</sup>  
1. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, Новосибирская обл.,  
р.п. Кольцово, тел./факс: (383) 336-75-40.  
2. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской  
области», 664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, д. 51,  
тел./факс: (3952) 22-82-04

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
630559, р.п. Кольцово., Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: V-598

Генеральный директор



А.Н. Сергеев

Исп.: Бузачев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 25.10.2012 № 03.15/3480

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм V/Irkutsk/02/2012  
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурыманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
Соболев И.А.,<sup>1</sup> Шестопалов А.М.,<sup>1</sup> Верховина М.М.,<sup>2</sup>  
Казанова В.В.<sup>2</sup>  
1. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, Новосибирская обл.,  
р.п. Кольцово, тел./факс: (383) 336-75-40.  
2. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской  
области», 664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, д. 51,  
тел./факс: (3952) 22-82-04

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
630559, р.п. Кольцово., Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: V-599

Генеральный директор

А.Н. Сергеев



Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 25.10.2012 № 03.15/3478

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм В/Omsk/7/2012  
(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г.,<sup>1</sup> Дурьманов А.Г.,<sup>1</sup> Ильичева Т.Н.,<sup>1</sup>  
Соболев И.А.,<sup>1</sup> Шестопапов А.М.,<sup>1</sup> Гречко С.Н.<sup>2</sup>  
1. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 630559, Новосибирская обл.,  
р.п. Кольцово, тел./факс: (383) 336-75-40.  
2. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»,  
644116, Омская область, г. Омск, ул. 27-я Северная, д. 42-а,  
тел./факс: (3812) 68-09-77

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-597**

Генеральный директор

А.Н. Сергеев



Исп.: Булычев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru <http://www.vector.nsc.ru> ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 13.08.2012 № 03.15/2743

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

вирус гриппа штамм В/Vladivostok/98/2012

(название штамма и вида микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурыманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А.,  
Шестопалов А.М., Яровенко Г.М.<sup>1</sup>, Гореликов В.Н.<sup>1</sup>, Кожан В.Н.<sup>1</sup>,  
Баранов В.Н.<sup>1</sup>

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Тел./Факс: (383) 336-75-40

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»<sup>1</sup>

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-595**

Генеральный директор



А.Н. Сергеев

Исп.: Булачев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**  
**«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**  
**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 г.п. Колызово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
 E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1066476048122 ИНН 5433161342

От 13.08.2012 № 0315/2744

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
 микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на депонирование:

вирус гриппа штамм В/Vladivostok/102/2012

(название штамма и вида микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Соболев И.А.,  
 Шестопалов А.М., Яровенко Г.М.<sup>1</sup>, Гореликов В.Н.<sup>1</sup>, Кожан В.Н.<sup>1</sup>,  
 Баранов В.Н.<sup>1</sup>

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
 Тел./Факс: (383) 336-75-40

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»<sup>1</sup>

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, г.п. Колызово, Новосибирская обл.  
 (организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: V-596

Генеральный директор



*А.Н. Сергеев* А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Д.Е.  
 Тел. (383) 306-15-10



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

 **ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской области. Телефон: (383) 336-60-10. Факс: (383) 336-74-09  
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 25.10.2012 № 03/15/3481

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм В/Magadan/478/2012

(название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурыманов А.Г., Ильичева Т.Н.,  
Соболев И.А., Шестопалов А.М.  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, Новосибирская обл.,  
р.п. Кольцово, тел./факс: (383) 336-75-40.

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.  
(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-600**

Генеральный директор



А.Н. Сергеев

Исп.: Бульчев Л.Е.  
Тел. (383) 306-15-10





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
 «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

**ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»**

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области Телефон: (383) 336-60-10 Факс: (383) 336-74-09  
 E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 05.04.2013 № 03.15/1153

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Справка о депонировании штамма  
 микроорганизма

### СПРАВКА

Государственная коллекция Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций,  
 риккетсиезов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» приняла на патентное депонирование:

вирус гриппа штамм В/Novosibirsk/01k/2013  
 (название вида и штамма микроорганизма)

Авторы штамма: Курская О.Г., Дурыманов А.Г., Ильичева Т.Н.,  
 Соболев И.А., Рыжиков А.Б.

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"  
 630559, р.п. Кольцово,  
 Новосибирская обл., тел. (383) 363-60-10

Депозитор: ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"  
 630559, р.п. Кольцово,  
 Новосибирская обл.

(организация, адрес)

Принятый в коллекцию штамм получил регистрационный номер: **V-630**

Генеральный директор



*А.Н. Сергеев*  
 А.Н. Сергеев

Исп.: Булычев Л.Е.  
 Тел. (383) 306-15-10