

На правах рукописи

СОБОЛЕВ
Иван Андреевич

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИРУСОВ ГРИППА
А(Н3N2) И В, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РФ С
2008 ПО 2013 ГГ.

03.02.02 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» и в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Научный руководитель:

Шестопалов Александр Михайлович, ВРИО директора ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», доктор биологических наук (06.02.02), профессор.

Официальные оппоненты:

Игнатъев Георгий Михайлович, заместитель директора ФГУП СПб научно-исследовательский институт вакцин и сывороток по научной работе, доктор медицинских наук (03.02.02), профессор.

Щелканов Михаил Юрьевич, заведующий научной лабораторией экологии микроорганизмов Дальневосточного федерального университета, доктор биологических наук (03.02.02), профессор.

Ведущая организация: Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского

Защита состоится «» _____ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 04; e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); <http://www.influenza.spb.ru>.

Автореферат разослан « » _____ года

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. Грудинина, 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 создает ситуацию, когда из всего разнообразия вариантов вируса, циркулирующих среди людей, исследуется только малая часть. Это усугубляется обширностью территории РФ и географической отдаленностью 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 NA и NA и установить филогенетические связи исследованных изолятов вируса гриппа А.
4. Охарактеризовать генетическую изменчивость NA и NA, а также определить паттерн накопления аминокислотных замен в поверхностных гликопротеинах.
5. 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 и, следовательно, с уклонением от иммунного ответа организма-хозяина.

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

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

5. 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 том числе 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С 2008 по 2013 года на территории азиатской части РФ осуществлялся сбор клинических образцов от пациентов с проявлением симптомов острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). Всего было собрано 2640 проб, из которых было выделено 416 штаммов вирусов гриппа различных типов и субтипов. В рамках этой работы было исследовано 29 штаммов вируса гриппа А(Н3N2) и 33 штамма вируса гриппа В.

Забор мазков из зева и носа от людей с симптомами ОРВИ осуществлялся в первые трое суток от начала заболевания стерильными вискозными тампонами на пластиковых аппликаторах.

Для выявления вируса гриппа в клинических образцах использовали набор реагентов «ПЦР-комплект вариант FRT «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» («АмплиСенс», Россия) с детекцией результатов в режиме реального времени.

Выделение вируса гриппа из клинических образцов (мазки из зева и носа) проводили в культуре клеток MDCK.

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).

Выделение вирусной РНК осуществляли с использованием набора QIAamp®Viral RNA MiniKit в соответствии с протоколом производителя.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Для амплификации фрагментов вирусного генома посредством ПЦР использовали набор Quick-Load Taq 2X Master Mix (BioLabs, Великобритания) и специфические праймеры.

Разделение продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле с использованием TAE буфера. Визуализацию проводили после окраски бромистым этидием при освещении УФ-светом. Экстракцию фрагментов ДНК из геля проводили коммерческим набором QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Для определения нуклеотидных последовательностей использовали наборы BigDye Terminator 3.1v Cycler, BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя и автоматический генетический анализатор 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием специализированного программного обеспечения: Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), SeqMan (Lasergene) и специализированных ресурсов Influenza Virus Resource (Bao Y., et al., 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).

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость HA и NA вирусов гриппа А(Н3N2)

Для комплексной оценки изменчивости штаммов различных сезонов относительно друг друга, а также относительно вакцинных штаммов, были использованы матрицы попарных эволюционных дистанций, построенные на основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Результаты представлены в виде «тепловых карт» (рис. 1, 2). Как для нуклеотидных, так и для аминокислотных последовательностей показано постепенное увеличение дистанций относительно вакцинных штаммов, что свидетельствует о кумулятивном накоплении мутаций.

В пределах отдельных эпидемических сезонов выявлено сходство последовательностей HA большинства штаммов, за исключением штамма A/Novosibirsk/02d/2012 эпидемического сезона 2011-2012 гг. (рис. 1), который отличается от остальных штаммов сезона и, согласно анализу аминокислотных замен, относится к другой генетической подгруппе.

При анализе дистанций между последовательностями HA 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 $0,0332 \pm 0,0022$, соответственно. При этом дистанции между HA штаммов сезона 2008-2009 гг. и сезонов 2010-2011, 2011-2012 гг. схожи: $0,0131 \pm 0,0012$, $0,0139 \pm 0,0016$ по нуклеотидным последовательностям, $0,0173 \pm 0,0019$ и $0,0205 \pm 0,0021$ – по аминокислотным.

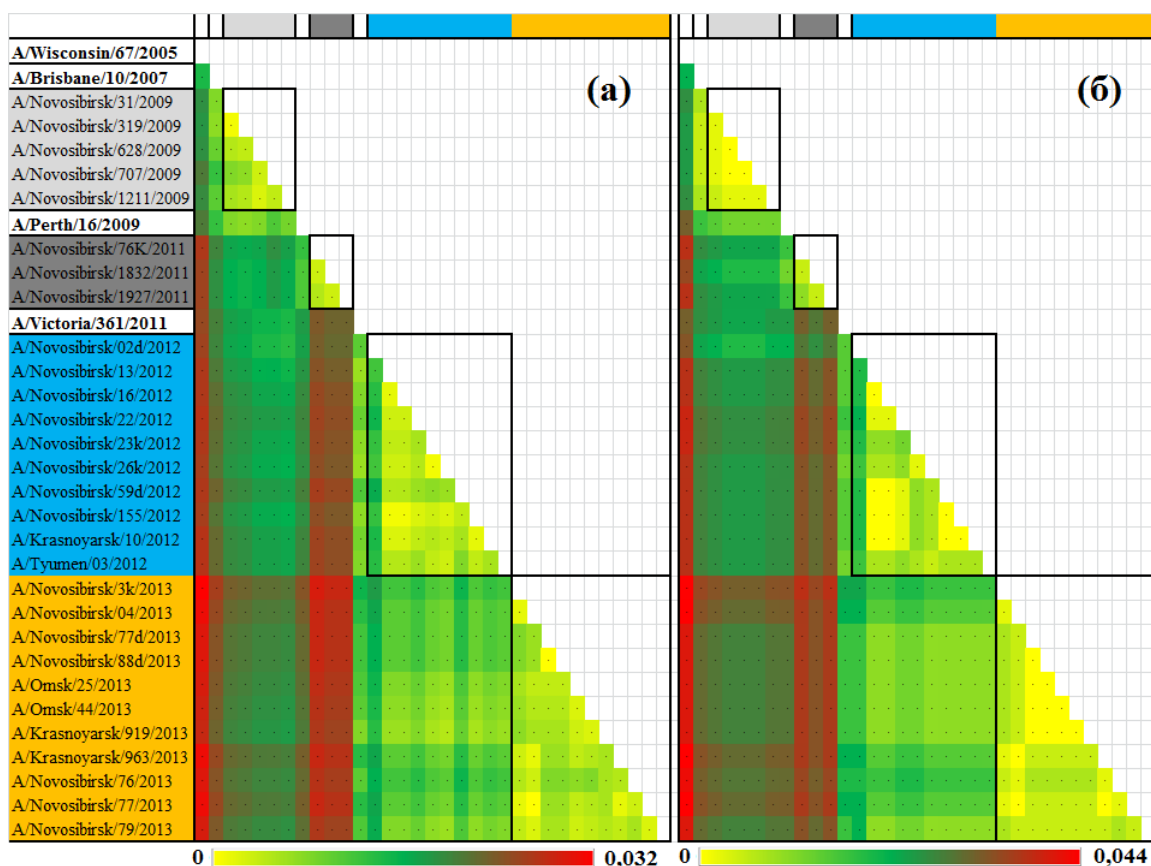


Рисунок 1. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями HA штаммов вируса гриппа А(Н3N2).

Таким образом, штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям HA равноудалены от штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг.

При анализе дистанций (рис. 2) между последовательностями NA штаммов разных эпидемических сезонов обнаружено, что штаммы предпандемического сезона 2008-2009 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. При этом, последовательности NA штаммов эпидемических сезонов 2011-2012 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 $0,167 \pm 0,0020$ и $0,0194 \pm 0,0031$ на нуклеотидном и аминокислотном уровнях, соответственно. 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.

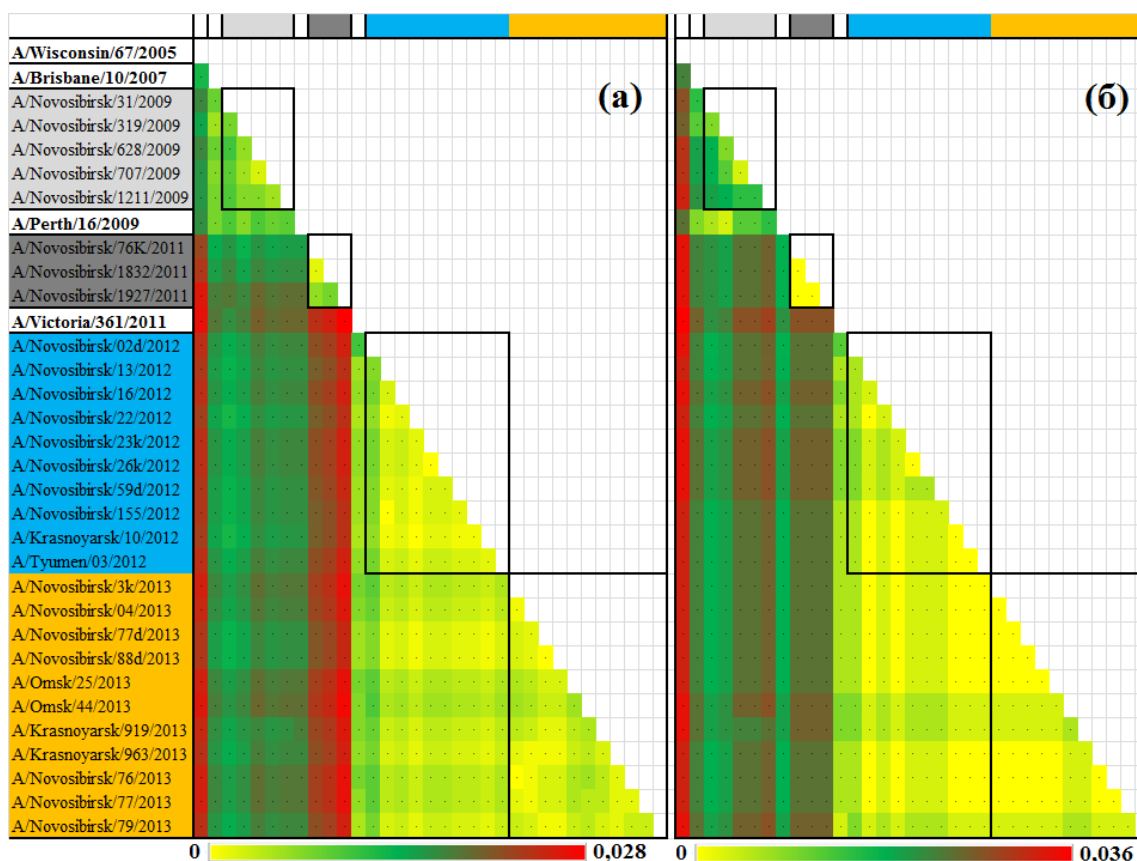


Рисунок 2. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями НА штаммов вируса гриппа А(Н3N2).

Следовательно, по структуре НА, также, как и в случае с HA, штаммы двух постпандемических эпидемических сезонов эволюционно равноудалены от штаммов предпандемического сезона. При этом последовательности НА штаммов сезона 2011-2012 гг. значительно дистанцированы от НА штаммов предыдущего сезона 2010-2011 гг.

Исходя из анализа эволюционных дистанций, можно заключить, что штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям НА и NA значительно отличались от других исследованных штаммов и относились к иной генетической кладе.

Одним из методов анализа последовательностей является построение филогенетических сетей (Рис. 3, 4). Филогенетические сети позволяют наглядно представить группы схожих последовательностей и визуально оценить различия между ними.

НА и 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). При этом, пул штаммов сезона 2008-2009 гг. характеризуются наибольшей гетерогенностью нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих поверхностные гликопротеины.

Штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. по нуклеотидным последовательностям НА филогенетически разделяются на две группы (рис. 3). Одну составляют штаммы A/Novosibirsk/31/2009 и A/Novosibirsk/319/2009, а другую - A/Novosibirsk/628/2009, A/Novosibirsk/707/2009 и A/Novosibirsk/1211/2009. Первая группа штаммов филогенетически приближена к кладе Brisbane/10, а во вторую входят дрейфовые (в направлении клады Victoria/208) варианты вируса. По структуре НА штаммы эпидемического сезона 2008-2009 гг. являются дрейфовыми вариантами,

филогенетически дистанцированными от вакцинных штаммов (рис. 4). Кроме того, штамм A/Novosibirsk/31/2009 филогенетически отличается от других штаммов сезона и близок к штаммам клады Victoria/208.

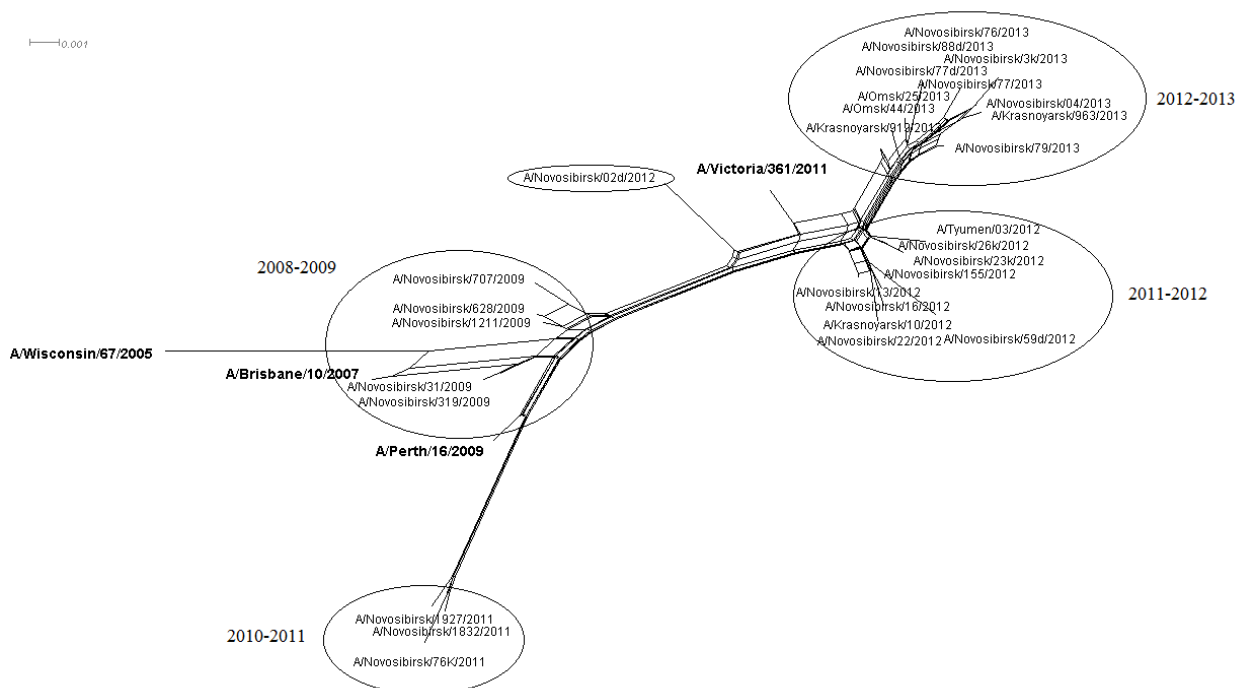


Рисунок 3. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур гена HA штаммов вируса гриппа А Н3N2.

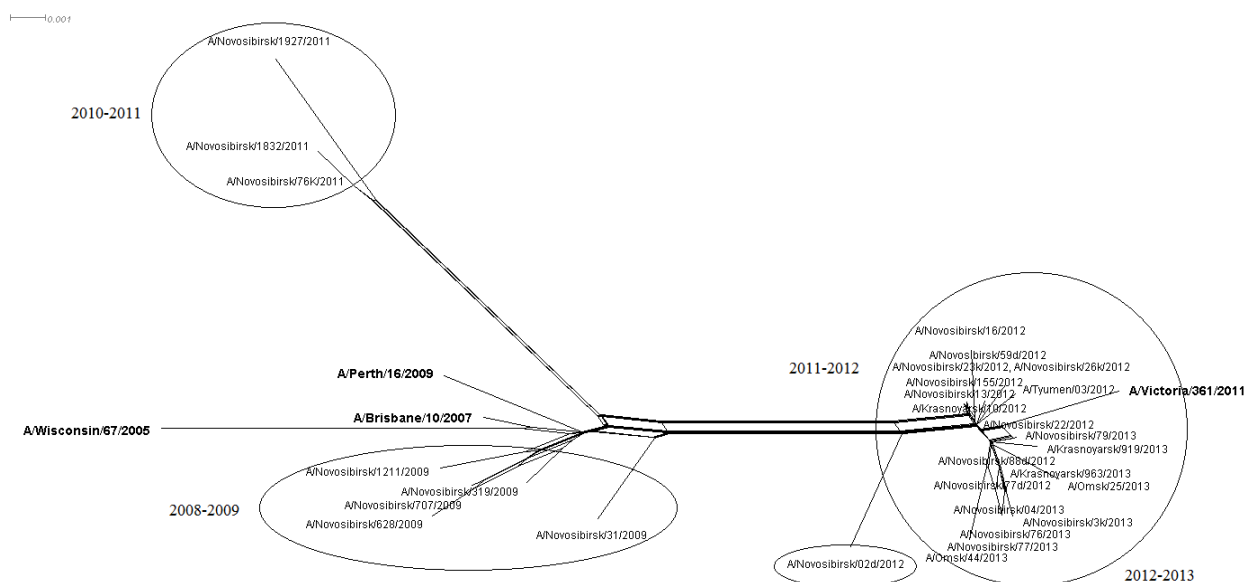


Рисунок 4. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур гена NA штаммов вируса гриппа А Н3N2.

Можно отметить, что штаммы сезона 2010-2011 гг. по первичным структурам генов НА и NA наиболее дистанцированы от остальных исследованных изолятов, как от предпандемических, так и от постпандемических. Это указывает на то, что эти и близкородственные им штаммы появились во время пандемии вируса гриппа А(H1N1) pdm09, но затем перестали циркулировать или же изменились в результате значительного

генетического дрейфа, который привел к радикальным изменениям в паттерне аминокислотных замен. Кроме того, по первичной структуре как HA, так и NA (в большей степени) штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. значительно дистанцированы от актуального вакцинного штамма A/Perth/16/2009. При этом штаммы остальных сезонов генетически схожи с соответствующими эталонными штаммами. Следовательно, штаммы, выделенные в 2010-2011 гг. по сравнению со штаммами других сезонов были результатом более значительного генетического дрейфа относительно актуального вакцинного штамма.

Аминокислотные замены обуславливают антигенный дрейф, 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 обнаружено 23 аминокислотных позиции (табл. 1) в HA, в которых происходили замены, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. на исключены штаммоспецифические замены).

Таблица 1. 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. Красным, зеленым, синим, желтым, фиолетовым цветами выделены антигенные сайты.

| Антигенный сайт | HA1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | HA2 | | | |
|-------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|---|---|---|
| | C | C | C | E | V | A | A | A | V | D | V | V | D | E | E | C | C | * | 347 | 361 | 428 | | | |
| A/Brisbane/10/2007 | Q | S | T | E | E | T | R | N | N | K | P | K | N | A | T | 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 | |
| A/Perth/16/2009 | | | | | K | | | K | | N | | Q | K | | | | | | | | * | | 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 | |
| A/Victoria/361/2011 | | N | I | | | | | | | N | | Q | 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 |
| A/Novosibirsk/26k/2012 | R | N | I | | | | | | | N | | Q | K | S | A | I | | | | | K | S | * | R |
| 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 |
| A/Novosibirsk/04/2013 | R | N | I | | | A | G | | | S | N | Q | K | S | A | I | M | | | | K | S | * | M |
| 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 |
| A/Novosibirsk/76/2013 | | N | I | | | A | G | | | S | N | Q | K | S | A | I | M | | | | K | S | * | M |
| A/Novosibirsk/77/2013 | R | N | I | | | A | G | | | S | N | Q | K | S | A | I | M | | | | K | S | * | M |
| A/Novosibirsk/79/2013 | R | N | I | | | A | G | | | N | | Q | K | S | A | I | M | | | | K | S | * | R |

Из 23 позиций аминокислотных замен - 20 обнаружено в субъединице HA1 (антигенно активная субъединица), а из них 17 – во всех пяти 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.

Из 20 позиций аминокислотных замен в НА1 – 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 штаммспецифическая, в эпидемическом сезоне 2012-2013 гг. 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 обнаружили в отдельных штаммах эпидемических сезонов 2011-2012 и 2012-2013 гг.

По паттерну аминокислотных замен из всего пула изученных последовательностей выделяются НА 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 (G50K, E62K, N144K, K158N, P162S, N189K, I260M, R261Q), впервые (с 2008 г.) обнаруженных именно в штаммах эпидемического сезона 2010-2011 гг., всего 3 замены (K158N, N189K, I260M) встречались в дальнейшем.

Для штаммов остальных эпидемических сезонов резкое изменение в паттерне аминокислотных замен не характерно. Изменение первичной структуры НА происходило последовательно, с сохранением большинства замен, появившихся в предыдущих сезонах. Именно замены, обуславливающие изменение антигенных свойств вируса, оказываются значимыми и закрепляются в популяции. Так, большинство выявленных аминокислотных замен сохранялось в популяции на протяжении нескольких сезонов.

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

Примечательно, что не всегда значительные изменения аминокислотного состава коррелировали со сменой штаммов в составе вакцины. Аминокислотные последовательности НА1 штаммов, изолированных в эпидемические сезоны 2008-2009 и 2010-2011 гг., отличались 8 заменами, что коррелировало со сменой вакцинного штамма с A/Brisbane/10/2007 на A/Perth/16/2009 (в феврале 2010 г.). Однако, несмотря на наличие 15 аминокислотных замен между НА1 штаммов эпидемических сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг., в феврале 2011 г. в качестве вакцинного штамма вируса гриппа А(Н3N2) был предложен A/Perth/16/2009. Только в феврале 2012 года (т.е. на эпидемический сезон 2012-2013 гг.) произошла смена вакцинного штамма с A/Perth/16/2009 на A/Victoria/361/2011.

За четыре эпидемических сезона обнаружено 19 позиций (табл. 2) в НА, в которых происходили аминокислотные замены. Из 19 аминокислотных позиций 5 относятся к антигенным сайтам НА. Из анализа исключены позиции, в которых обнаружены одиночные замены, т.е. рассматриваются положения, замены в которых обнаружены в двух и более штаммах, изолированных в азиатской части РФ.

Рассматривая динамику появления характерных (встречающихся в нескольких штаммах) для отдельных эпидемических сезонов аминокислотных замен в НА, 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 гг. 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 гг. от штаммов, изолированных в другие сезоны, но и дифференцируют штаммы в пределах сезона.

Таблица 2. Позиции в NA, 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. Желтым, фиолетовым и оранжевым цветами выделены антигенные сайты.

| Антигенный сайт | | | | | | | | | | | 4 | 4 | 5 | 5 | 6 | | | | |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 9 | 81 | 93 | 127 | 147 | 151 | 215 | 221 | 307 | 338 | 339 | 342 | 367 | 369 | 402 | 430 | 463 | 464 | 469 |
| A/Brisbane/10/2007 | T | L | D | D | D | D | I | E | I | L | D | N | S | K | N | R | D | I | I |
| A/Novosibirsk/31/2009 | | | | | N | | V | | | | | | | | | | | | L |
| A/Novosibirsk/319/2009 | | | | | N | G | V | | | | | | | | | | | | |
| A/Novosibirsk/628/2009 | | | | | N | G | V | D | | | N | | | | | | N | | |
| A/Novosibirsk/707/2009 | | | | | N | A | V | D | | | N | | | | | | N | | |
| A/Novosibirsk/1211/2009 | | | | | N | | V | D | | | | | | | | | N | | |
| A/Perth/16/2009 | | | | | N | | V | | | | | | | | | | | | |
| A/Novosibirsk/76/2011 | | | | N | N | | V | | M | F | | D | | | D | S | | | |
| A/Novosibirsk/1832/2011 | | | | N | N | | V | | M | F | | D | | | D | S | | | |
| A/Novosibirsk/1927/2011 | | | | N | N | | V | | M | F | | D | | | D | S | | | |
| A/Victoria/361/2011 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/02d/2012 | | P | | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | M |
| A/Novosibirsk/13/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/16/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | V |
| A/Novosibirsk/22/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/23k/2012 | S | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/26k/2012 | S | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/59d/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/155/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Krasnoyarsk/10/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Tyumen/03/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Texas/50/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/3k/2013 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/04/2013 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/77d/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/88d/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Omsk/25/2013 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Omsk/44/2013 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Krasnoyarsk/919/2013 | | P | G | | N | | V | D | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Krasnoyarsk/963/2013 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/76/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/77/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |
| A/Novosibirsk/79/2012 | | P | G | | N | | V | | | | | | N | T | D | | | L | |

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. Замена I464L, обнаруженная в штамме эпидемического сезона 2008-2009 гг. и классифицированная как спорадическая, в эпидемических сезонах 2011-2012 гг. и 2012-2013 гг. 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.).

Мутации в положении 151 были обнаружены в NA трех штаммов вируса гриппа A(H3N2), выделенных в течение эпидемического сезона 2008-2009 гг. Известно, что аминокислотный остаток в положении 151 входит в состав активного центра NA 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. Кроме того, показано, что эта замена снижает чувствительность вируса к занамивиру.

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 A/Novosibirsk/707/2009, а также штамм A/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.

Иных мутаций (Q136K, E119V, E119V+I222V, del244-247, R292K, N294S), ассоциированных со снижением чувствительности к ингибиторам нейраминидазы, выявлено не было.

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 гг., всего 1 замена N402D встречалась в последующих сезонах.

Последовательное (в пределах одной генетической клады) изменение паттерна накопления 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 циркулирующей клады вирусов гриппа A(H3N2).

Для визуализации изменчивости гемагглютинина и нейраминидазы на аминокислотном уровне были построены филогенетические дендрограммы (Рис. 5). Все последовательности NA на аминокислотном уровне подразделяются на две основные крупные филогенетические ветви: группы штаммов, относящихся к кладам A/Brisbane/10 и A/Perth/16 и штаммы, относящиеся к кладе A/Victoria/208. Последовательности NA, относящиеся к кладам A/Brisbane/10 и A/Perth/16, хотя и относятся к одной крупной ветви филогенетического дерева, формируют две отдельные группы, что соответствует изменениям в составе вакцины. С другой стороны, различия между последовательностями NA (как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровне) штаммов сезонов 2010-2011 и 2011-2012 гг., не соответствуют сохранению штамма A/Perth/16/2009 в составе вакцины.

Среди последовательностей NA можно выделить 4 группы: штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2008-2009 гг., за исключением A/Novosibirsk/31/2009, штаммы, изолированные в эпидемический сезон 2010-2011 гг., штамм A/Novosibirsk/31/2009 и штаммы, изолированные в эпидемические сезоны 2011-2012 и 2012-2013 гг.

Дистанцированность 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.

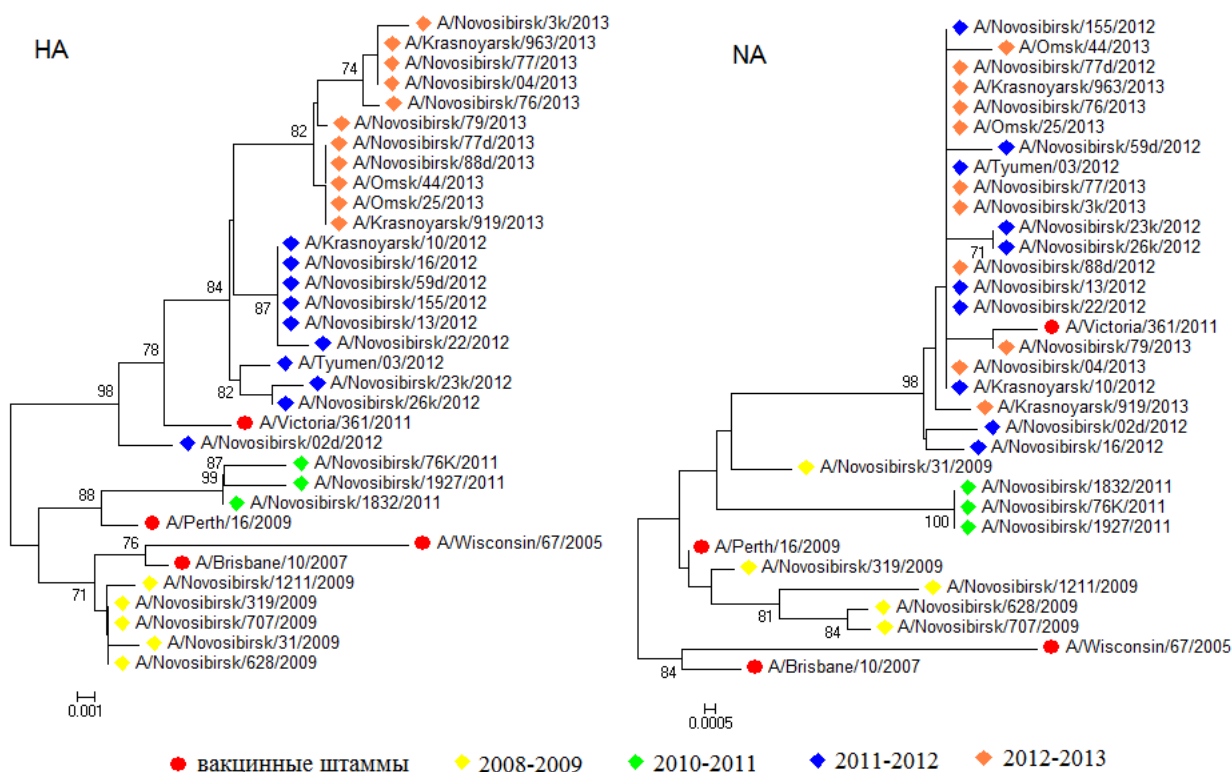


Рисунок 5. Дендрограммы, построенные на основе аминокислотных последовательностей HA и NA штаммов вируса гриппа А H3N2. Черными маркерами отмечены вакцинные и референс-штаммы.

Характер филогенетических связей, как для нуклеотидных, так и для аминокислотных последовательностей HA и NA (дистанцированность исследованных штаммов разных эпидемических сезонов, смена циркулирующих клад, выраженный дрейф в пределах отдельных генетических клад) указывает на то, что сезонная циркуляция вируса гриппа А(H3N2) на территории азиатской части РФ обуславливалась множественными заносами вирусов извне и, по генетическому разнообразию, соответствовала циркуляции сезонных вариантов вируса гриппа в мире. При этом, из вирусов гриппа А(H3N2) двух генетических клад (Victoria/208 и Perth/16), циркулирующих в мире в течение эпидемического сезона 2010-2011 гг. на территории азиатской части РФ были обнаружены только штаммы, относящиеся к кладе Perth/16.

В HA исследованных штаммов аминокислотные замены происходили в основном в субъединице HA1, где большинство мутаций оказалось локализовано в антигенных сайтах, изменения в которых потенциально могут оказывать влияние на антигенные характеристики вирусов.

Изменчивость HA и NA вируса гриппа В Генетическая линия В/Victoria

При анализе эволюционных дистанций между последовательностями HA (рис. 6) 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. Штаммы постпандемического сезона 2010-2011 гг. по аминокислотной последовательности HA также эволюционно

дистанцированы от схожих между собой штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 гг. 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: $0,0044 \pm 0,0012$.

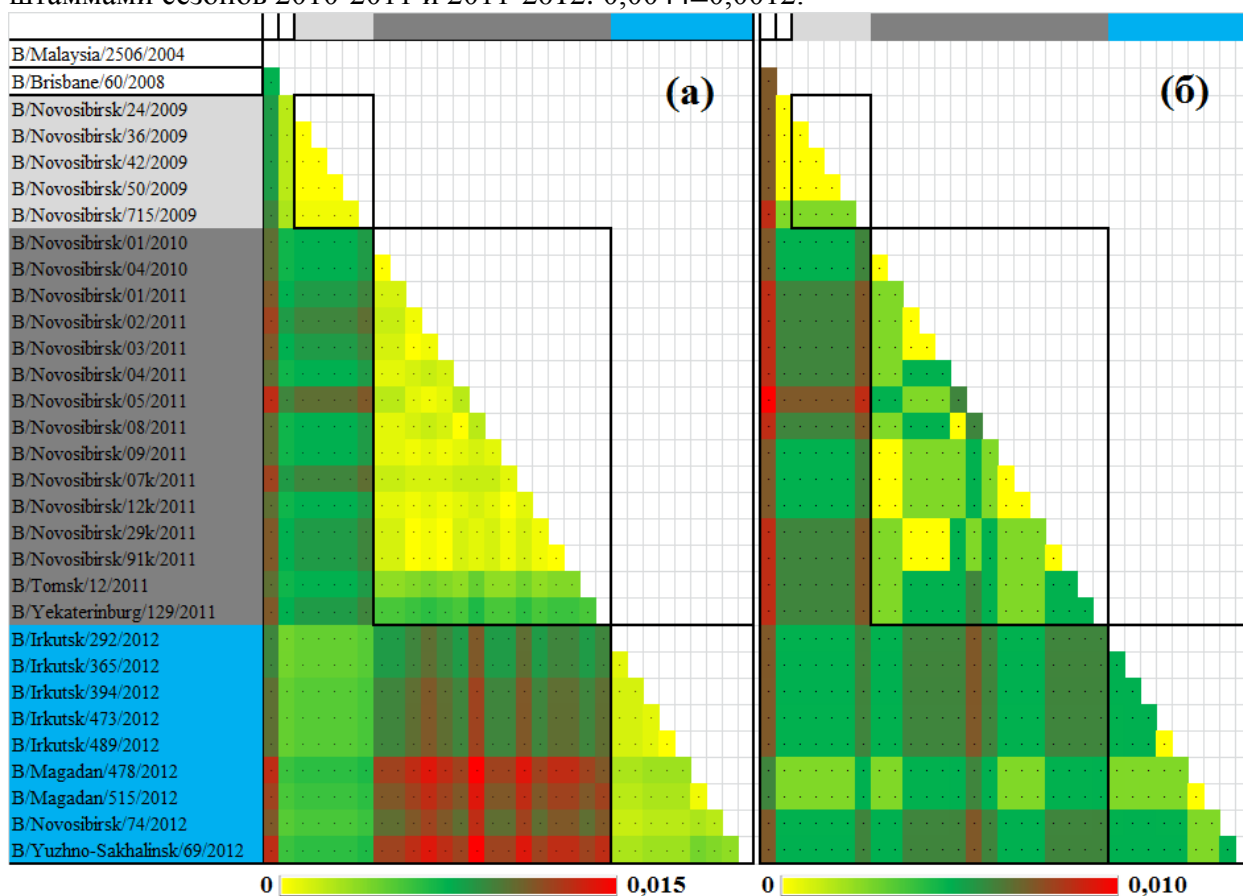


Рисунок 6. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями НА штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria.

В целом, на аминокислотном уровне, НА исследованных нами 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. Таким образом, в пределах отдельных эпидемических сезонов изолировались как штаммы схожие между собой по первичной структуре НА (до полной идентичности), так и штаммы, содержащие различное количество аминокислотных замен.

Согласно матрицам эволюционных дистанций штаммы эпидемического сезона 2011-2012 гг. по структуре НА (рис. 7) 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 НА 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 НА 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.

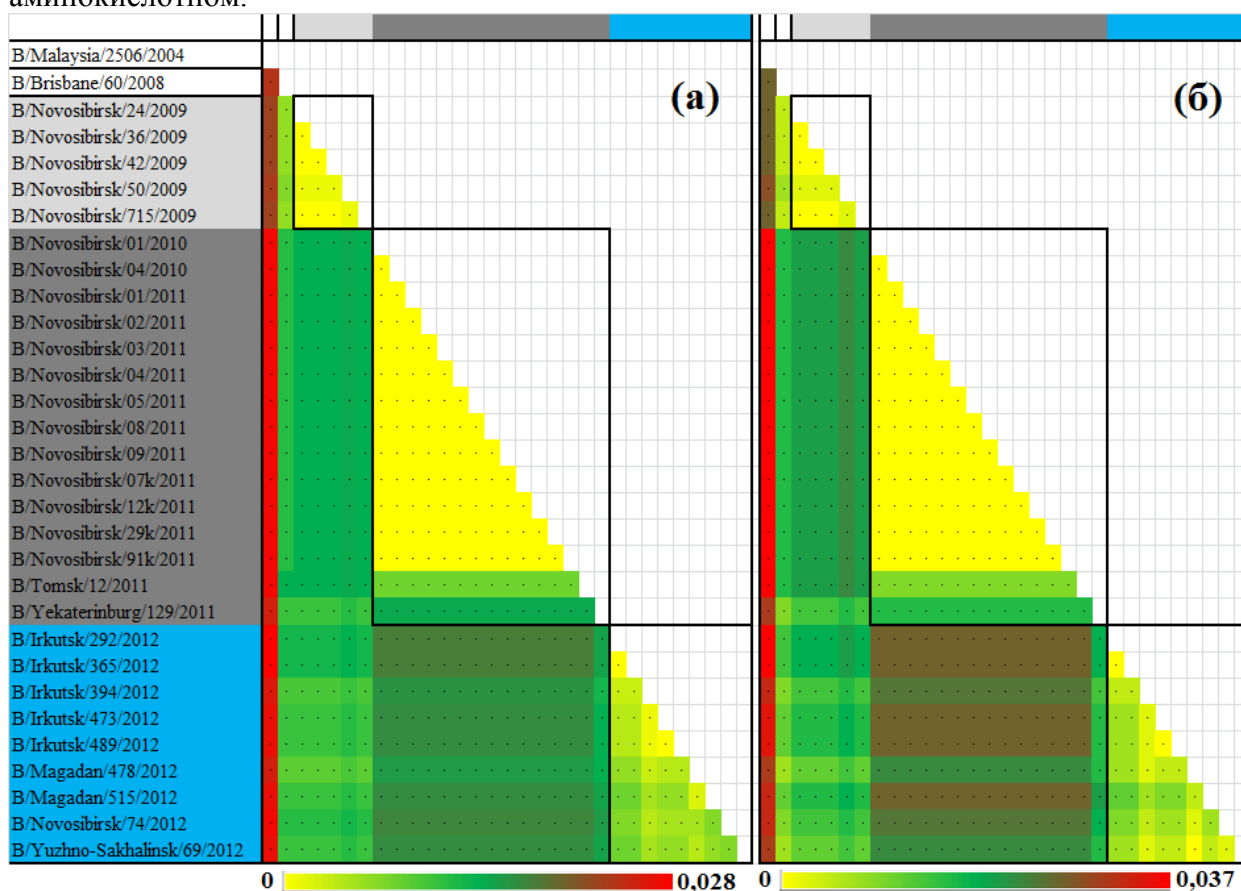


Рисунок 7. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Victoria.

После пандемии вируса гриппа А(H1N1) pdm09 произошло увеличение эволюционных дистанций между исследованными штаммами вируса гриппа В генетической линии В/Victoria и предыдущим вакцинным штаммом В/Malaysia/2506/2004 и в дальнейшем изменения 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 В/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 НА, при неизменной эволюционной дистанции относительно НА штамма В/Malaysia/2506/2004, изменялся относительно НА вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008. Таким образом, динамику изменения эволюционных дистанций относительно В/Malaysia/2506/2004 можно охарактеризовать как увеличение с последующей стабилизацией. Иной паттерн изменчивости оказался характерен для генетических дистанций относительно штамма В/Brisbane/60/2008. После пандемии (эпидемический сезон 2010-2011 гг.) произошло значительное увеличение эволюционных расстояний НА исследованных штаммов от НА В/Brisbane/60/2008, а штаммы следующего эпидемического сезона 2011-2012 гг. по первичной структуре гена НА оказались менее дистанцированы от этого вакцинного штамма, чем штаммы предыдущего эпидемического сезона.

За три эпидемических сезона обнаружено 5 позиций в НА, в которых происходили аминокислотные замены относительно вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008 и

исследованных штаммов разных эпидемических сезонов, при условии, что замена встречалась в двух и более штаммах (т.е. исключены спорадические замены) (табл. 3). Из этих замен – 3 в субъединице HA1. Две мутации (L58P, V146I) – в антигенных сайтах, т.е., вероятно, ассоциированы с изменением антигенных свойств вирусов.

Таблица 3. Позиции в HA, 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 VA, фиолетовый - BE. Светло-серый цвет - замены, закрепившиеся более чем на один эпидемический сезон.

| Антигенный сайт | BE | VA | | | | |
|-----------------------------|----|-----|-----|---|-----|-----|
| Нумерация по B/Lee/40 | 58 | 146 | 266 | * | 527 | 558 |
| | 58 | 146 | 267 | * | 528 | 559 |
| B/Brisbane/60/2008 | 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(HA) | | V | | * | | |
| B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012 | | V | | * | | |

Наибольшей гетерогенностью аминокислотных последовательностей HA отличаются штаммы, выделенные в эпидемический сезон 2010-2011 гг., несмотря на то что большинство из них было изолировано в одном географическом регионе. В аминокислотных последовательностях HA исследованных штаммов за рассмотренные эпидемические сезоны обнаружены вариабельные позиции, в которых со сменой эпидемического сезона происходили неоднократные замены аминокислот. Так в HA штаммов сезона 2010-2011 гг. произошла аминокислотная замена L58P относительно штаммов сезона 2009-2010 гг., которая затем отсутствовала в штаммах сезона 2011-2012.

Обнаружено 15 позиций (табл. 4), в которых происходили аминокислотные замены в HA относительно вакцинного штамма B/Brisbane/60/2008, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. из анализа исключены штаммспецифические замены). Две (329 и 340) аминокислотные позиции из 15 относятся к антигенным сайтам 3 и 4 HA.

Выявлено большее количество (по сравнению с HA) аминокислотных замен между последовательностями HA штаммов выделенных в разные эпидемические сезоны. По

структуре NA 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.

Таблица 4. 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/Brisbane/60/2008 | S | I | L | P | L | L | P | N | S | N | N | E | G | A | D | | |
| B/Novosibirsk/24/2009 | | | | | | | | | | | | | | | E | | N |
| B/Novosibirsk/36/2009 | | | | | | | | | | | | | | | E | | N |
| B/Novosibirsk/42/2009 | | | | | | | | | | | | | | | E | | N |
| B/Novosibirsk/50/2009 | | | | | | | | | | | | | | | E | | N |
| B/Novosibirsk/715/2009 | | | | | | | | | | | | | | | E | | N |
| B/Novosibirsk/01/2010 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/04/2010 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/01/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/02/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/03/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/04/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/05/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/08/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/09/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/07k/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/12k/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/29k/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Novosibirsk/91k/2011 | L | | P | S | F | | S | D | | D | | | | | | | |
| B/Tomsk/12/2011 | L | | | S | F | | | D | | D | | | | | | | |
| B/Yekaterinburg/129/2011 | | | | | F | | | | | D | | | | | | T | |
| B/Irkutsk/292/2012 | | M | | | | | | K | R | | D | K | | | T | | |
| B/Irkutsk/365/2012 | | M | | | | | | K | R | | D | K | | | T | | |
| B/Irkutsk/394/2012 | | | | | | | | | R | | D | K | | | T | | |
| B/Irkutsk/473/2012 | | | | | | P | | | R | | D | K | | | T | | |
| B/Irkutsk/489/2012 | | | | | | P | | | R | | D | K | | | T | | |
| B/Magadan/478/2012 | | | | | | | | | R | | D | K | | | | | |
| B/Magadan/515/2012 | | | | | | | | | R | | D | K | | | | | |
| B/Novosibirsk/74/2012 | | | | | | | | | R | | D | K | | | | | |
| B/Yuzhno-Sakhalinsk/69/2012 | | | | | | | | | R | | D | K | | | | | |

Кроме того, у аминокислотной последовательности NA 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 4 различных аминокислотных остатка: N-D-N/K.

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 в поверхностных гликопротеинах, чем при сравнении со штаммами эпидемического сезона 2010-2011 гг.

Филогенетические сети наглядно показывают наличие двух кластеров генетически близких последовательностей НА, схожих с вакцинным штаммом B/Brisbane/60/2008 (Рис. 8).

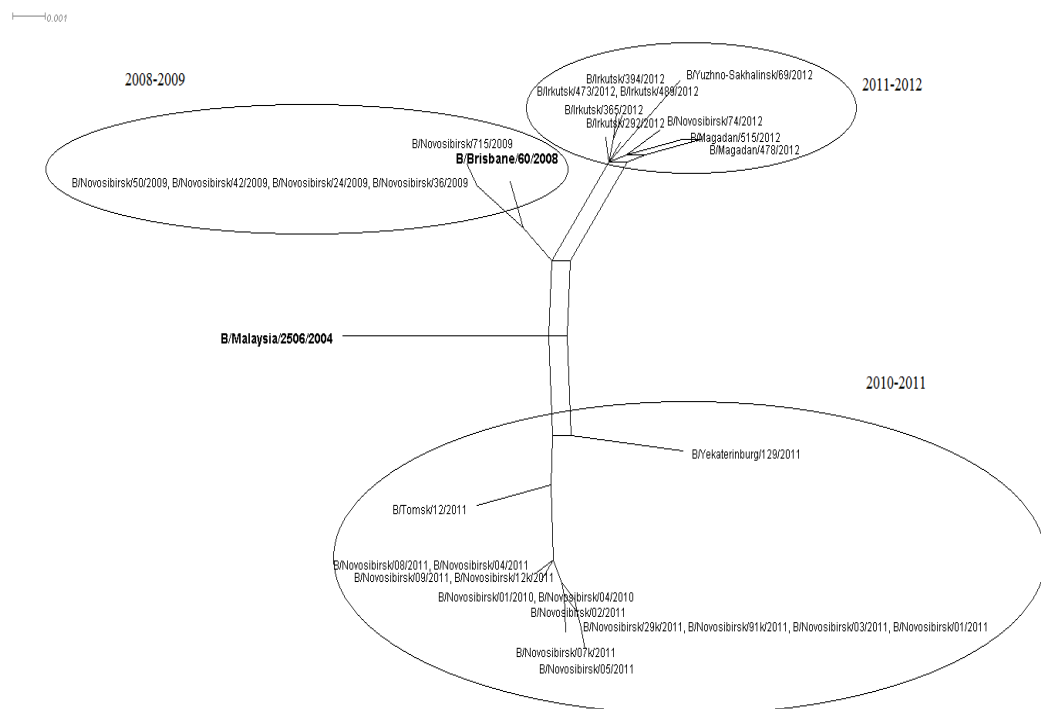


Рисунок 8. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих НА штаммов вируса гриппа В.

Эти кластеры сформированы последовательностями НА штаммов эпидемических сезонов 2008-2009 и 2011-2012 гг. Штаммы эпидемического сезона 2010-2011 гг. по нуклеотидным последовательностям НА значительно дистанцированы как от штаммов предыдущего и последующего эпидемических сезонов, так и от актуального вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008.

Для нуклеотидных последовательностей NA (рис. 9) также показано сходство в пределах отдельных эпидемических сезонов.

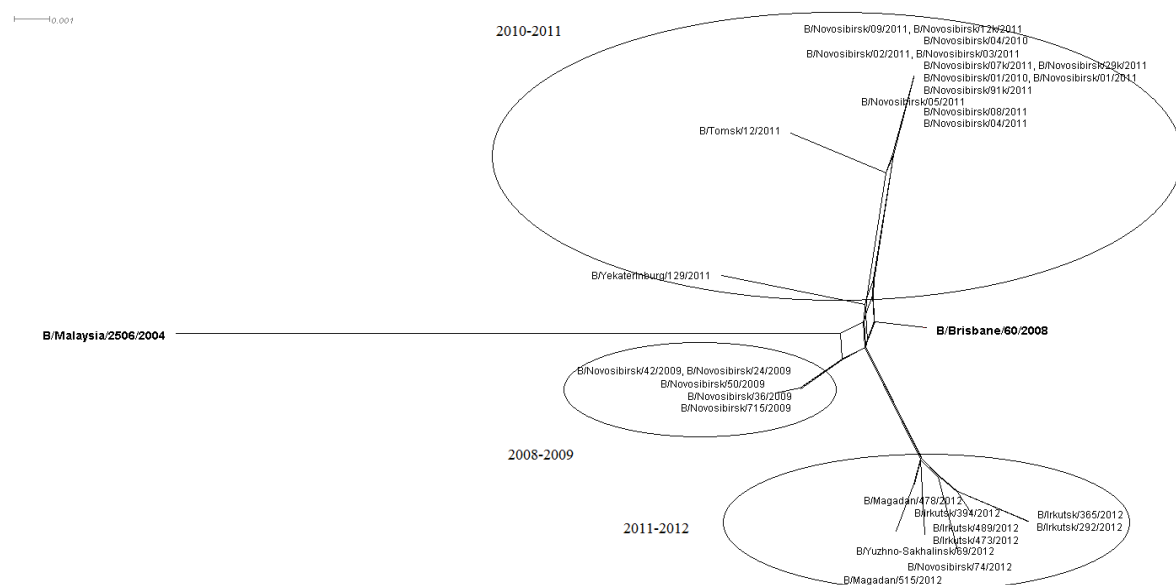


Рисунок 9. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа В

Примечательно, что исследованные штаммы всех трех эпидемических сезонов филогенетически дистанцированы от вакцинного штамма В/Brisbane/60/2008.

Кроме того, показаны генетические различия (как для HA, так и для NA) между штаммами эпидемического сезона 2010-2011 гг., изолированными в Новосибирске и в других населенных пунктах (Томск, Екатеринбург). При этом, в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг. в разных городах (Новосибирск, Иркутск, Магадан и Южно-Сахалинск) выделялись штаммы с генетически схожими HA и NA. Возможно, штаммы, циркулировавшие в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., характеризовались меньшей вариабельностью HA и NA, чем штаммы, циркулировавшие непосредственно после пандемии гриппа А(H1N1) pdm09

Генетическая линия В/Yamagata

Согласно попарным эволюционным дистанциям, можно отметить большие, чем в случае с вирусами гриппа линии В/Victoria, значения дистанций между HA российских изолятов эпидемического сезона 2012-2013 гг. и вакцинным штаммом предыдущего сезона (рис. 10). 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.

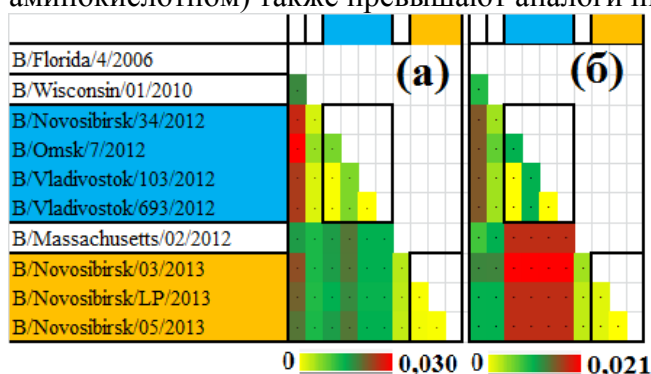


Рисунок 10. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями HA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata.

Российские штаммы вируса гриппа В линии В/Yamagata, изолированные в течение эпидемического сезона 2011-2012 гг., по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям NA (рис.11) 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.

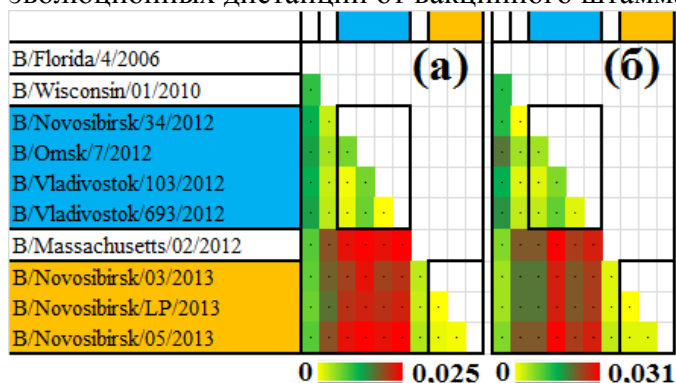


Рисунок 11. а) «тепловая карта» на основе генетических попарных дистанций. б) «тепловая карта» на основе попарных дистанций между аминокислотными последовательностями NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata.

Согласно тепловым картам, 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 нуклеотидным и аминокислотным последовательностям HA и NA принадлежали к двум различным генетическим группам.

За два эпидемических сезона обнаружено 11 позиций в гемагглютинине (табл. 5), в которых происходили аминокислотные замены, при условии, что замена встречалась в двух и более из исследованных штаммов (т.е. исключены спорадические замены).

Все 11 аминокислотных позиций локализованы в субъединице HA1 (антигенно активная субъединица), а из них 6 – в антигенных сайтах BA, BB2, BC и BD. Таким образом, штаммы двух последовательных эпидемических сезонов отличаются по 6 положениям аминокислотных замен, расположенным в антигенных сайтах. Вероятно, замены именно в этих положениях ассоциированы 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).

Рассматривая динамику появления характерных (встречающихся в нескольких штаммах) для отдельных эпидемических сезонов аминокислотных замен в HA, можно отметить, что в пределах отдельных эпидемических 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.

Таблица 5. 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 |
| В/Wisconsin/01/2010 | 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 |
| В/Massachusetts/02/2012 | 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 | | |

В целом же эпидемические сезоны значительно отличаются по паттернам распределения аминокислотных замен, что коррелирует с дальнейшими изменениями в составе вакцины.

Обнаружено 11 позиций в нейраминидазе, в которых происходили аминокислотные замены (табл. 6).

Одна замена (N340D) локализована в антигенном сайте 4. Замены, обнаруженные в штаммах эпидемического сезона 2011-2012 гг. в дальнейшем не выявлены в штаммах сезона 2012-2013 гг. В позиции 36 замена I36M обнаружена в двух штаммах эпидемического сезона 2011-2012 гг., в то время как в остальных штаммах обнаружен аминокислотный остаток I36, также характерный для штаммов следующего эпидемического сезона. Таким образом, паттерны накопления аминокислотных замен в HA отличаются по 10 из 11 позиций аминокислотных замен, зафиксированных в вирусной популяции.

Таблица 6. 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/Wisconsin/01/2010 | I | R | T | T | K | R | I | S | N | N | T |
| B/Novosibirsk/34/2012 | | | | | | | | | | | |
| B/Omsk/7/2012 | | | | | | | | | | | |
| B/Vladivostok/103/2012 | M | | | | | | | | | | |
| B/Vladivostok/693/2012 | M | | | | | | | | | | |
| B/Massachusetts/02/2012 | | Q | A | I | T | K | V | R | D | D | A |
| 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 |

При анализе аминокислотного состава NA исследованных штаммов не было обнаружено мутаций (E119A, E119A/D, E119G, E119V, R152K, D198E, D198N, D198Y, I222T, I222V/I, H274Y, R292K, N294S, R371K, G402S), ассоциированных со снижением чувствительности к ингибиторам нейраминидазы.

Исходя из структур филогенетических сетей (Рис. 12, 13), можно отметить, что штаммы вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata, изолированные в течение двух последовательных эпидемических сезонов, формировали два различных кластера, что коррелирует со сменой вакцинных штаммов.

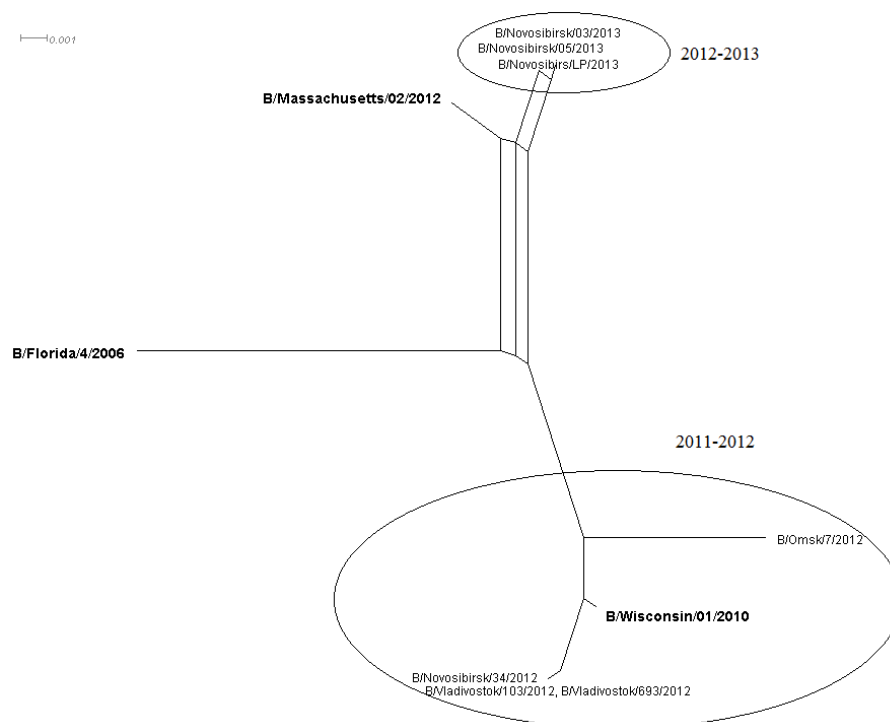


Рисунок 12. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих NA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata.

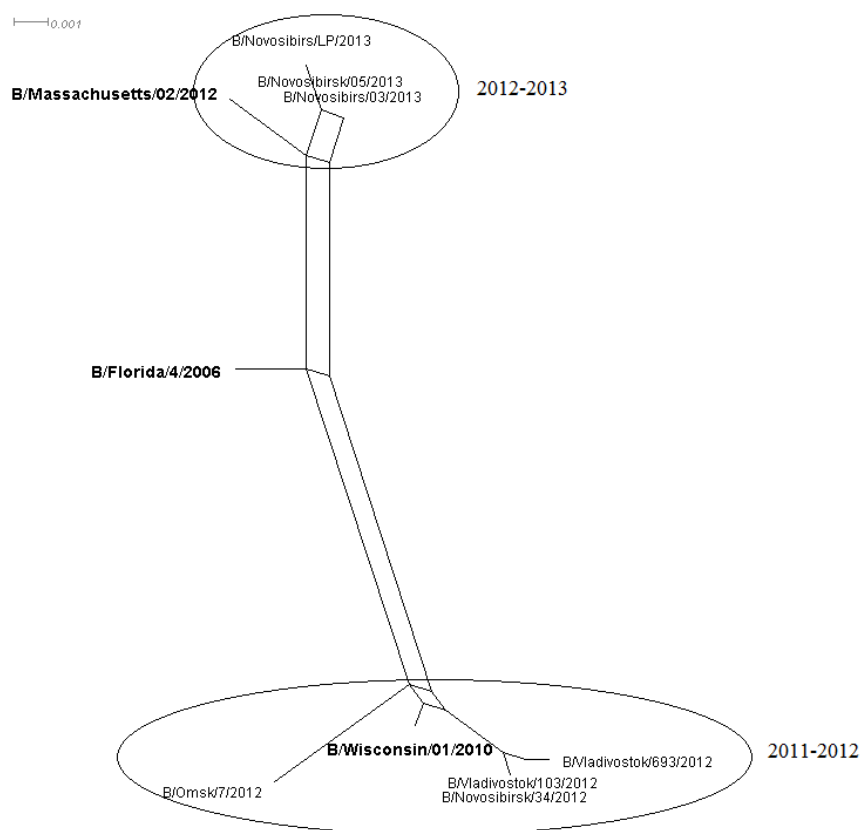


Рисунок 13. Филогенетическая сеть, построенная на основе первичных структур генов, кодирующих HA штаммов вируса гриппа В генетической линии В/Yamagata.

Из структур филогенетических дендрограмм, построенных на основе аминокислотных последовательностей (Рис. 14), следует, что все исследованные последовательности вирусов гриппа В подразделяются на две основные генетические линии – В/Victoria и В/Yamagata.

Последовательности характеризуются низкой степенью гетерогенности, особенно в пределах отдельных эпидемических сезонов (вплоть до полной идентичности). При этом нейраминидаза характеризуется большей вариабельностью, чем гемагглютинин, как при смене циркулирующих штаммов (между сезонами), так и в пределах отдельных сезонов (в частности 2011-2012).

В целом, по первичным структурам HA и NA исследованные штаммы 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. Из различий в длинах ветвей дендрограмм следует, что в сравнении со штаммами линии В/Yamagata, штаммы генетической линии В/Victoria характеризуются меньшей изменчивостью первичной структуры белка HA.

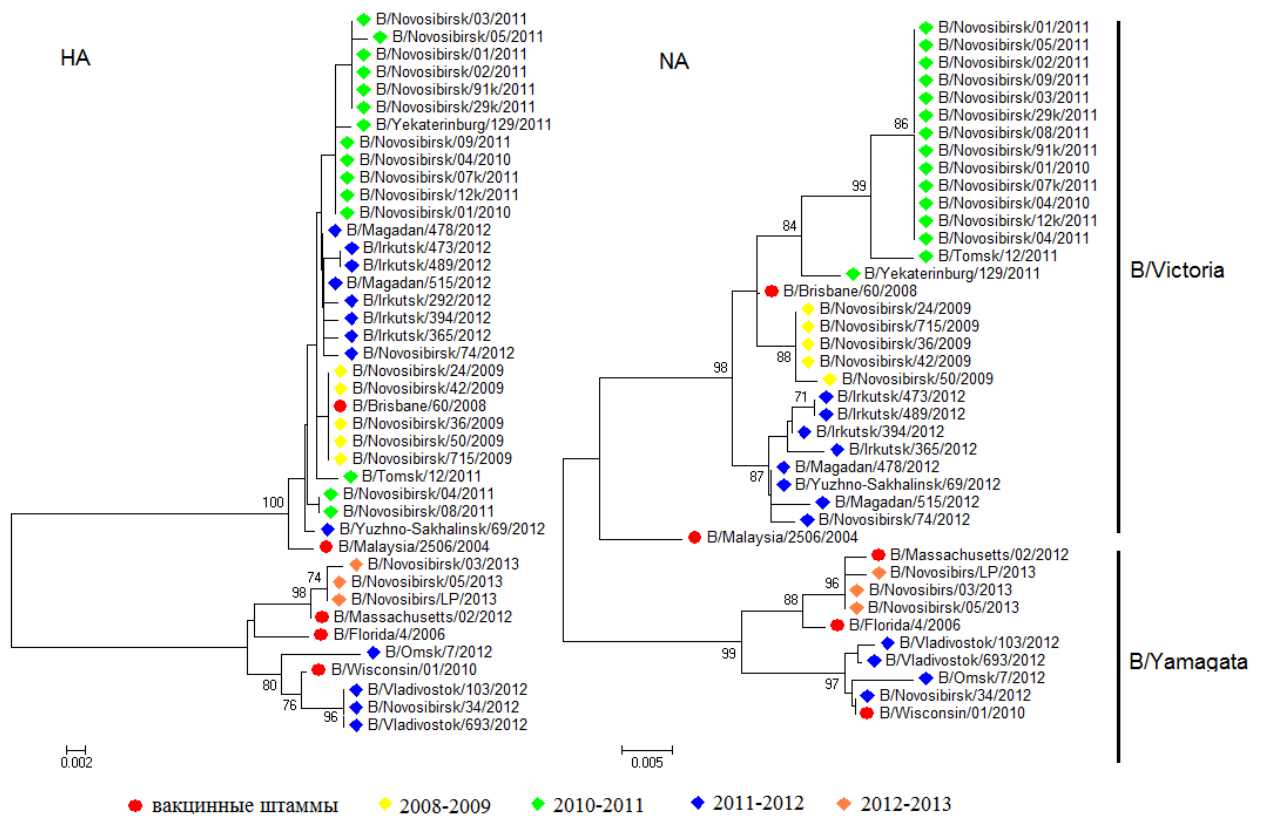


Рисунок 14. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей HA и NA штаммов вируса гриппа В. Черными маркерами отмечены вакцинные и референс-штаммы.

Выводы:

- 1) 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.

б) 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Sobolev I. Molecular genetic analysis of influenza A/H3N2 virus strains isolated in Western Siberia in the 2010-2011 epidemic season / Sobolev I, Kurskaya O, Susloparov I, Pyicheva T, Shestopalov A. // *Infect Genet Evol.* - 12(8). - 2012. - P. 1694-1698 - DOI: 10.1016/j.meegid.2012.07.014.

2. Pyicheva T. Monitoring of influenza viruses in Western Siberia in 2008-2012 / Pyicheva T, Sobolev I, Susloparov I, Kurskaya O, Durymanov A, Sharshov K, Shestopalov A. // *Infect Genet Evol.* - 20. - 2013. - P. 177-187. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.08.025.

3. Курская О.Г. Анализ эпидемиологической ситуации по гриппу на юге Западной Сибири в 2012-2013 гг. / Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Соболев И.А., Иванова Е.В., Гречко С.Н., Логиновских Н.В., Горбатовская Л.М., Беспалов В.С., Ильичева Т.Н., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б. // *Сибирский научный медицинский журнал.* - Т. 34. - № 1. – 2014. - С. 48-53.

4. Курская О.Г. Анализ эпидемической ситуации по гриппу в 2011-2012 годах в Западной Сибири / Курская О.Г., Соболев И.А., Дурьманов А.Г., Дронова С.А., Шестопалов А.М., Ильичева Т.Н. // *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.* - Т. 11 - № 1. – 2013. - С. 118-124.

5. Соболев И.А. Изменчивость вируса гриппа типа А / Соболев И.А., Курская О.Г., Шаршов К.А., Прокопьева Е.А., Алексеев А.Ю., Гаджиев А.А., Шестопалов А.М. // *Юг России: экология, развитие* - Т. 11. - № 1. -2016. - С. 170-177.

6. Соболев И.А. Эпидемиологическая ситуация по гриппу на юге Западной Сибири в 2011-2012 гг. / Соболев И.А., Курская О.Г., Иванова Е.В., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Михеев В.Н., Шестопалов А.М. // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук* - № 5-1 (87). – 2012. -С. 122-126.

Тезисы конференций:

1. Соболев И.А. Чувствительность вирусов гриппа 2008-2009 гг. к противовирусным химиопрепаратам / Соболев И.А., Романовская А.А., Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Шестопалов А.М. // *Астана биотех 2011: Материалы 2-ой Международной конференции* - Астана, 2011. - С.77.

2. I. A. Sobolev. Influenza virus resistance to antiviral drugs: rimantadine, oseltamivir and arbidol / I. A. Sobolev, A. A. Romanovskaya, O. G. Kurskaya, A. G. Durymanov, T. N. Pyicheva, A. M. Shestopalov // *Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance.* - Rio de Janeiro, 2011. – P. 47.

3. Pыcheva T. Influenza A/H1N1 pdm virus A. in Western Siberia in 2009-2011 / Pыcheva T., Kurskaya O., Durymanov A., Susloparov I., Sobolev I., Shestopalov A. // Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interaction, - Hong-Kong, 2011. - P.78.
4. Sobolev I.A. Influenza virus sensitivity to antiviral drugs: rimantadine, oseltamivir and arbidol / Sobolev I.A., Romanovskaya A.A., Kurskaya O.G., Durymanov A.G., Pыcheva T.N., Shestopalov A.M. // Influenza 2011: Zoonotic Influenza and Human Health, 4th Oxford Intern. Influenza Conf. – Oxford, 2011. - P.12-13.
5. Sharshov K.A. Avian and Human Influenza Virus Surveillance in Asian part of Russia (2010-2011) // Sharshov K.A., Durymanov A.G., Sivay M. V., Saifutdinova S.G., Marchenko V.Yu., Kurskaya O.G., Sobolev I.A., Susloparov I.M., Zaikovskaya A.V., Alekseev A.Yu., Pыcheva T.N., Shestopalov A.M. // XIV International Symposium on Respiratory Viral Infections - Istanbul, 2011. – P.56).
6. Игнашкина М.Б. Мониторинг гриппа в Сибири 2009-2011 гг. / Игнашкина М.Б., Курская О.Г., Дурьманов А.Г., Глущенко А.В., Соболев И.А., Шестопалов А.М., Ильичева Т.Н. // Современные технологии обеспечения биологической безопасности: материалы III научно-практич. школы-конф. молодых ученых и специалистов науч.-исслед. организаций Роспотребнадзора - Оболенск, 2011. - С.30-32.
7. Sobolev I. Investigation of Circulation of the Influenza Virus in the Human Population in Western Siberia in 2011-2012 / Sobolev I., Kurskaya O., Durymanov A., Pыcheva T., Shestopalov A. // Programme and Abstract book: Incidence, Severity, and Impact: an isirv International Conference on Seasonal and Pandemic Influenza - Munich, 2012, p.67.
8. Курская О.Г. Особенности эпидемического сезона по гриппу 2011-2012 гг. на юге Западной Сибири / Курская О.Г., Соболев И.А., Иванова Е.В., Дурьманов А.Г., Ильичева Т.Н., Михеев В.Н., Шестопалов А.М. // Сборник тезисов конференции «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика, лечение» - Санкт-Петербург, 2012. - С. 53.
9. Sobolev I. Influenza A/H3N2 virus isolated in Siberia (Asian part of Russia), 2008-2013 / Sobolev I., Kurskaya O., Pыcheva T., Durymanov A., Shestopalov A. // 4th International Influenza Meeting - Munster, 2014. - P. 144.
10. Соболев И.А., Курская О.Г. Изменчивость поверхностных гликопротеинов штаммов вируса гриппа А(Н3N2), изолированных на территории Западной Сибири с 2008 по 2013 гг. / Соболев И.А., Курская О.Г. // Научно–практическая конференция–биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение- Санкт-Петербург, 2014 – С. 10.
11. Соболев И.А. Вирус гриппа А/Н3N2 на территории азиатской части РФ с 2008 по 2013 гг. / Соболев И.А., Курская О.Г., Шестопалов А.М. // Международная научно-практическая конференция «Вопросы образования и науки» - Тамбов, 2015. - С. 121-122.
12. Курская О.Г. Роль вируса гриппа в этиологии острых респираторных вирусных инфекций у детей Новосибирской области / Курская О.Г., Соболев И.А., Дорош А.В., Аношина А.В., Леонова Н.В., Горбатовская Л.М., Патрушева Ю.Н., Рябиченко Т.И. // Международная научно-практическая конференция «Наука, образование, общество: проблемы и перспективы развития» - Тамбов, 2015. – С. 122-123.
13. Соболев И.А. Генетическое разнообразие штаммов вируса гриппа А (Н3N2) и вируса гриппа В, изолированных на территории азиатской части РФ с 2009 по 2013 гг. / Соболев И.А., Курская О.Г. // Международная научно-практическая конференция «Наука и образование в жизни современного общества» - Тамбов, 2015. - С. 131-132.
14. Соболев И.А. Изменчивость поверхностных гликопротеинов вируса гриппа А (Н3N2) и В, изолированных на территории азиатской части РФ, 2009-2013 гг. / Соболев И.А., Курская О.Г. // Седьмая Всероссийская научно-практическая конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» - Новосибирск, 2015 - С. 267-268.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук, профессору Шестопалову Александру Михайловичу за помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Курской Ольге Григорьевне и Дурыманову Александру Гавриловичу за предоставление и поддержание клеточных линий, использованных в работе, а также за неоценимую помощь, оказанную в ходе выполнения данной работы. Автор выражает искреннюю признательность д.б.н. Ильичевой Татьяне Николаевне и к.б.н. Сулопарову Ивану Михайловичу. Особую благодарность автор выражает к.б.н. Алексееву Александру Юрьевичу и к.б.н. Шаршову Кириллу Александровичу, за всестороннюю поддержку и помощь при выполнении исследования.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ (№RFMEFI61315X0045) и грантом РФФИ (14-04-32268 мол_а).