

Л.В. Лейбенко^{1,2}, В.П. Поліщук¹, Л.В. Радченко², А.П. Міроненко²

¹ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601

²ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського»
НАМН України, вул. Амосова, 5, Київ, Україна, 03680, тел.: +38 (044) 275 02 97,
e-mail: leiblu@mail.ru

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ ЛЮДЕЙ A(H₃N₂), ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ В ЕПІДЕМІЧНОМУ СЕЗОНІ 2011–2012 РОКІВ

Метою роботи було провести генетичний аналіз сегментів, що кодують гемаглютинін (HA) та нейрамінідазу (NA) вірусів грипу типу A(H3N2), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011–2012 років. У даному дослідженні були використані методи: real-time RT-PCR, робота з культурою клітин MDCK-siat, секвенування і філогенетичний аналіз. Проаналізовані генетичні сегменти HA і NA українських вірусів грипу A(H3N2), виділених у епідемічному сезоні 2011–2012 рр. та побудовані відповідні філогенетичні дерева методом об'єднання найближчих сусідів (Neighbor-Joining) з використанням моделі Kimura 2-parameter. Статистична оцінка філогенетичного аналізу проведена із застосуванням методу бутстреп-аналізу (Bootstrap). Проаналізована генетична подібність досліджуваних ізолятів до вакцинного штаму та вірусів виділених у світі. Детально проаналізовані всі генетичні групи кластеру Victoria/208, куди увійшли виділені нами ізоляти. Описані ключові мутації в амінокислотних послідовностях HA і NA. В роботі були виявлені множинні шляхи заносу епідемічних вірусів грипу A(H3N2) в сезоні 2011–2012 рр. в Україну. Мутації в гемаглютиніні українських ізолятів знаходились у високоваріабельних ділянках і не були пов'язані зі зміною властивостей вірусів. Аналіз амінокислотних послідовностей NA показав відсутність мутацій E119V, E119V+I222V, R292K і N294S, з якими асоціюють появу резистентності до озельтамівіру та занамівіру.

Ключові слова: віруси грипу A(H3N2), нуклеотидні послідовності, філогенетичний аналіз.

Два підтипи вірусу грипу А – H1N1 і H3N2, ко-циркулюють в людській популяції протягом останніх трьох десятиліть [22]. Від часу, коли у 1968 році стався спалах “Гонконгського” грипу [21], віруси А(H3N2) залишаються найбільш частою причиною захворювань на грип.

Інформативним методом спостереження за динамікою еволюційного процесу у вірусів грипу є філогенетичний аналіз, що базується на встановленні еволюційних зв'язків між досліджуваними вірусами на основі



порівняння їх геномів [2]. Вибір оптимального набору програм для філогенетичного порівняння забезпечує високу точність та адекватність аналізу [4]. Генетичний аналіз вірусів грипу проводять за сегментами, що кодують поверхневі антигени вірусу грипу: гемаглютинін (HA) та нейрамінідазу (NA) [5–7, 13, 17].

Ген гемаглютиніну кодує однойменний білок, який забезпечує проникнення вірусу до чутливої клітини. Також HA є основною мішенню для вірус-нейтралізуючих антитіл [16]. Зважаючи на високий рівень мутацій гемаглютиніну, він є цільовим геном молекулярного аналізу вірусів грипу.

Основною функцією нейрамінідази є руйнування сіалової кислоти на поверхні клітин, і вихід вірусу у міжклітинний простір. Антитіла проти NA можуть зменшувати тяжкість захворювання на грип, відіграючи таким чином додаткову роль у боротьбі з вірусом [10]. Нейрамінідаза постійно змінює амінокислотну послідовність для уникання від імунного нагляду хазяїна. Змінам в АК складі NA передують мутації в нуклеотидній послідовності кодуючого гену. Деякі точкові мутації в нейрамінідазі здатні призводити до резистентності вірусу до основних етіотропних хіміопрепаратів озелтамівіру та занамівіру. На сьогодні, відомі «гарячі позиції» в білку нейрамінідази, заміщення в яких призводить до появи резистентних штамів [11, 14]. Виявлення мутацій резистентності є важливим етапом при дослідженні чутливості вірусів грипу до хіміопрепаратів.

Метою роботи було провести генетичний аналіз сегментів, які кодують гемаглютинін та нейрамінідазу вірусів грипу типу A(H3N2), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011–2012 років.

Матеріали і методи

В роботі були використані носогорлянкові змиви від хворих, отримані з різних областей України під час епідемії. Дослідження клінічних зразків, типування та субтипівання проводили методом real-time RT-PCR. Виділення та накопичення вірусів проводили на культурі клітин MDCK-siat [15]. Секвенування виділених нами вірусів грипу проводилось у двох світових центрах грипу — в Лондоні (Великобританія) та Атланті (США). Для генетичного аналізу були взяті послідовності генів гемаглютиніну (HA) та нейрамінідази (NA) виділених в Україні вірусів грипу типу A(H3N2). Пошук подібних генетичних сегментів вірусів грипу здійснювали з використанням веб-ресурсу GISAID (<http://platform.gisaid.org/>). Ідентифікацію та порівняння послідовностей проводили за допомогою BLAST аналізу (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Вирівнювання послідовностей проводили із застосуванням алгоритму ClustalW. Філогенетичні дерева будували у програмі MEGA5 [20], методом Neighbor-Joining (об'єднання найближчих сусідів) [19], із застосуванням моделі Кімури (Kimura 2-parameter) [12]. Метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій



1000 використовували для статистичної оцінки значущості отриманих результатів [9]. Переведення нуклеотидних послідовностей в амінокислотні для пошуку заміщень проводили з використанням веб-ресурсу EMBOSSTranseq translates (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

Результати та їх обговорення

За результатами real-time RT-PCR аналізу, де було протестовано 401 клінічний зразок, відібраний в чотирьох дозорних центрах [1] України, віруси грипу А(Н₃Н₂) склали переважну більшість (207 із 209 позитивних зразків). Два зразки дали позитивний результат на грип В. Схожа картина спостерігалась по всьому європейському регіоні. За даними Європейського центру по контролю за інфекціями, в період з 1 вересня 2011 по 1 березня 2012 років більшість досліджених зразків (86%) були вірусами грипу А(Н₃Н₂), 6% — віруси грипу В лінії В/Yamagata, 4% — віруси грипу А(Н₁Н₁)pdm, і 3% — віруси грипу В лінії В/Victoria. В епідемічному сезоні 2011–12 рр. віруси грипу А(Н₃Н₂) домінували як в Україні, так і по всьому світі — 67% (http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/Interim_Report_September_2012_2.pdf), хоча в епідсезоні 2010–2011 рр. нами було виділено лише 2 ізоляти даного субтипу [3]. Нагадаємо, що для сезону 2011–2012 рр. у Північній півкулі прогнозували циркуляцію вірусів грипу А/Каліфорнія/7/09 (Н₁Н₁); А/Перт/16/09 (Н₃Н₂) та В/Брізбен/60/08, які увійшли до складу актуальних сезонних вакцин [18].

Генетичний аналіз проводили за генами гемаглютиніну (НА) та неїрамінідази (НА) вірусів грипу А(Н₃Н₂).

Філогенетичне порівняння генів гемаглютиніну (НА). Для генетичного аналізу було відібрано 15 послідовностей генів гемаглютиніну у вірусів, виділених нами у 2012 році з чотирьох дозорних центрів [11], а саме А/Ukraine/38/12, А/Ukraine/78/12, А/Ukraine/96/12, А/Ukraine/114/12, А/Ukraine/131/12, А/Ukraine/155/12, А/Ukraine/209/12, А/Ukraine/248/12, А/Ukraine/250/12, А/Dnipro/183/12, А/Dnipro/194/12 А/Odessa/288/12, А/Odessa/300/12, А/Odessa/312/12 та А/Khmelnytsky/484/12. Також були взяті два ізоляти з рутинного нагляду — А/Ukraine/5381/12, А/Ukraine/5339/12.

З веб-ресурсу GISAID за допомогою BLAST аналізу, були відібрані найбільш подібні ізоляти сезону 2011–2012 рр. та віруси, що відрізнялись значно. Відмінні послідовності взяті для аналізу картини мутаційної мінливості грипу у світі. Для відтворення еволюційних зв'язків з вірусами минулих епідемічних сезонів, взяті ізоляти А/Iowa/19/10, А/Alabama/5/10, А/Victoria/208/09, А/Victoria/210/09, А/Brisbane/10/07 та вакцинні штами А/Perth/16/09 (діючий) і А/Victoria/361/11 (новий, актуальний для сезону 2012–2013).

На етапі BLAST аналізу було помічено, що всі ізоляти сезону 2011–2012 рр. були подібними за генами НА на рівні 95% і більше. Про-

вівши генетичне порівняння 39 послідовностей генів НА, ми отримали філогенетичне дерево, показане на рисунку 1. Всі виділені віруси грипу були більш подібними до референс вірусу A/Victoria/208/09, а ніж до вакцинного штаму A/Perth/16/09 (рис. 1). Це дозволило віднести їх до Victoria/208 кластеру.

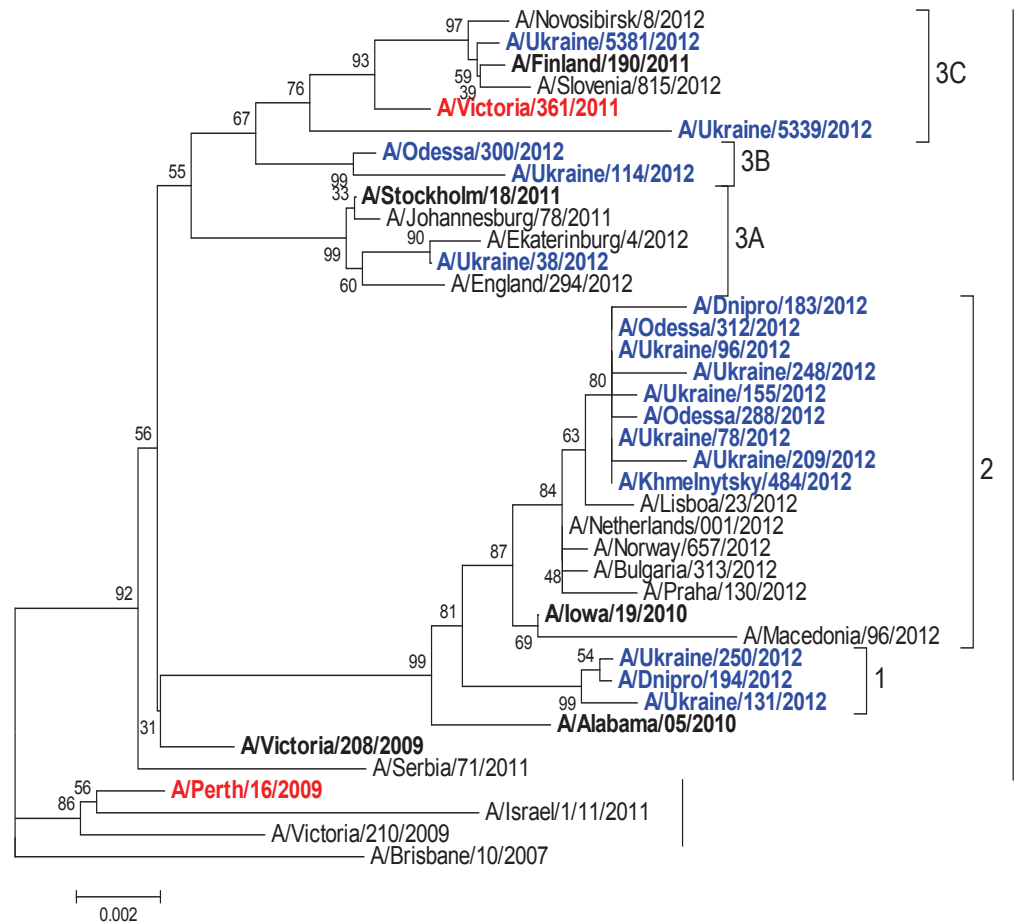


Рис. 1. Філогенетичний аналіз генів НА вірусів грипу А (H3N2) сезону 2011–2012 рр., проведений в програмі MEGA5. Еволюційна історія була відтворена методом NJ з 1000 бутстреп реплікацій. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу Kimura 2-parameter.

Fig. 1. Phylogenetic analysis of HA genes influenza A (H3N2) viruses, isolated in 2011–2012 season, conducted in MEGA5. Evolutionary history was reconstructed by NJ with 1000 BOOTSTRAP replications. Evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter.

Віруси даного кластеру набули нового заміщення T212A в АК послідовності гемаглютиніну, і ревертували до A/Brisbane/10/07, за заміщеннями K62E, K144N (набуття сайту глікозилювання [8]), порівняно з Perth/16-подібними вірусами. Частина ізолятів сезону 2010–2011 рр.



також належала до кластеру Victoria/208. Така спрямованість мутаційного добору показала необхідність вибору нового кандидата у вакцинні штами. Для сезону 2012–2013 таким став ізолят A/Victoria/361/11.

В межах кластеру Victoria/208 ізоляти розділились на 5 груп: 1, 2, 3А, 3В і 3С, детальний аналіз антигенних змін в гемаглютиніні яких подано далі (рис. 1):

1 група — віруси з заміщеннями D53N, Y94H, I230V та E280A. До даної групи увійшли наші ізоляти A/Ukraine/250/12, A/Ukraine/131/12 та A/Dnipro/194/12, а також референс-штам 2010 року — A/Alabama/5/10. Українські ізоляти A/Ukraine/250/12 і A/Dnipro/194/12 додатково набули заміщення R201K. А вірус A/Ukraine/250/12 також набув заміщення E344D.

2 група виявилась найчисленнішою, в межах якої розташувалась більшість українських вірусів грипу, виділених з усіх чотирьох дозорних центрів. Ізоляти групи характеризувались як заміщеннями D53N, Y94H, I230V, E280A, спільними з групою 1, так і додатковою мутацією S199A. Найближче до українських ізолятів на філогенетичному дереві розташувався вірус, виділений в Лісабоні, порівняно з яким наші 9 ізолятів набули одне заміщення — A212S. Це дає підстави говорити про одноразове занесення даної групи вірусів на територію країни. Ізолят A/Dnipro/183/12 набув АК заміщення P103L, а A/Ukraine/248/12 — I522K. Референс-штамом для даної групи був ізолят A/Iowa/19/10.

Всі віруси груп 3А, 3В та 3С показали заміщення V223I. Також ізоляти груп 3А і 3В набули заміщення N145S та D487N, а груп 3В і 3С — A198S і N312S.

3А група — віруси із заміщенням N144D (призводить до втрати сайту глікозилування) [13]. В межах даної групи розташувався досліджуваний ізолят A/Ukraine/38/2012. Референс-штамом для даної групи був A/Stockholm/18/2011.

3В група — об'єднала віруси A/Ukraine/114/2012 та A/Odessa/300/2012.

3С група — віруси з заміщеннями T48I та S45N (з'явився сайт глікозилування). До даної групи увійшли ізоляти A/Ukraine/5381/12 та A/Ukraine/5339/12. Вірус A/Ukraine/5381/12 разом з ізолятами з Новосибірську, Фінляндії і Словенії селектували АК заміщення Q33R та N278K. Ізолят A/Ukraine/5339/12 набув ряд АК заміщень: I58V, I223V, S262N, V347M та V490I. Отже, українські ізоляти з групи 3С A/Ukraine/5381/12 і A/Ukraine/5339/12 були занесені до країни з різних джерел.

При аналізі НА генів виділених в Україні вірусів грипу А(Н₃Н₂) в епідсезоні 2011–2012 років, в першу чергу привертає увагу факт розташування їх в усіх філогенетичних групах (рис. 1). Таким чином, в досліджуваному сезоні населення країни перехворіло всіма можливими варіантами вірусів грипу А(Н₃Н₂). Що свідчить про високу інтенсивність перетину кордону інфікованими людьми з множинним занесенням вірусів грипу на територію України та навпаки.

Філогенетичне порівняння генів нейрамінідази (NA). Порівнюючи гени нейрамінідази, ми спостерігали за інтенсивністю їх змін та кореляцією зі змінами в гемаглютиніні. Однак, не у всіх вірусів, взятих для аналізу, були секвеновані NA сегменти. Тому штамове різноманіття досліджуваних за генами NA та NA вірусів грипу дещо відрізняється. Для генетичного аналізу були взяті послідовності 13 виділених нами ізолятів поточної епідемії: A/Ukraine/78/12, A/Ukraine/96/12, A/Ukraine/114/12, A/Ukraine/131/12, A/Ukraine/155/12, A/Ukraine/209/12, A/Ukraine/248/12, A/Ukraine/250/12, A/Dnipro/183/12, A/Dnipro/194/12, A/Odessa/288/12, A/Odessa/300/12, A/Khmelnysky/484/12, ізолятів з рутинного нагляду — A/Ukraine/5329/12, A/Ukraine/5381/12 і A/Ukraine/5422/12. За результатами бласт-аналізу були відібрані ізоляти з інших країн, включаючи вакцинні штами A/Perth/16/09 і A/Victoria/361/11.

Як і при порівнянні генів NA, за генами NA всі виділені в епідемічний сезон 2011–2012 рр. віруси грипу А(Н3N2) знаходились в межах вікторіанського кластеру і були подібними до вакцинного штаму A/Perth/16/2009 (рис. 2). Українські ізоляти також були в різних філогенетичних групах. Майже всі віруси сезону 2011–2012 рр., також були більш подібними до нового вакцинного штаму A/Victoria/361/11, а ніж до діючого A/Perth/16/09. Це були віруси з груп 1, 2, 3B, 3C та ізолят з минулого епідемічного сезону A/Ukraine/175/11. Також групи 1, 2, 3B, 3C мали спільне заміщення N402D (рис. 2).

Віруси досліджуваного сезону (групи 1, 2, 3A, 3B і 3C) селектували заміщення S367N, K369T і I464L, порівняно зі штамами A/Perth/16/09 і A/Victoria/208/09. Групи були названі тими ж номерами, що і при порівнянні NA. Характеристика груп філогенетичного порівняння подана далі (рис. 2.).

1 група характеризувалась заміщеннями Y40C, I176M, G401S, та спільно зі штамом A/Ukraine/175/11 — R210K. В межах групи розташувались ізоляти A/Ukraine/131/12, A/Ukraine/250/12, A/Dnipro/194/12 та віруси, виділені в США і Естонії. Штам A/Ukraine/131/12 набув додатково мутацію K296R. Українські ізоляти показали високу однорідність, тому найвірогідніше поширились внаслідок разового занесення на територію країни.

2 група найчисельніша — в її межах розташувались українські ізоляти, виділені з усіх чотирьох дозорних регіонів у 2012 році. Більшість з них були ідентичними за АК послідовністю NA, але вірус A/Ukraine/5329/12 набув заміщень K415R, S416G і E435G, які віддалили його на філогенетичному дереві. Найбільш подібним до українських ізолятів виявився вірус, виділений в Лісабоні на початку лютого. Аналогічна картина спостерігалась при порівнянні генів NA. Тому з високою ймовірністю можна говорити, що дана популяція вірусів грипу, що циркулювали в Україні була занесена з Лісабону (Португалія) або навпаки.



3А група характеризувалась тим, що нейрамінідаза її вірусів зберегла подібність до «старого» вакцинного штаму A/Perth/16/09, хоча більшість з них було виділено навесні 2012 року. Віруси групи набули заміщень E221D, T238A і S416N. А ізоляти 2012 року також – S335G і I469V, серед них і ізолят з рутинного нагляду A/Ukraine/5422/12, який виявився подібним до вірусів з Англії, Ірландії та Росії. Референс-штамом для групи 3А став A/Stockholm/18/11.

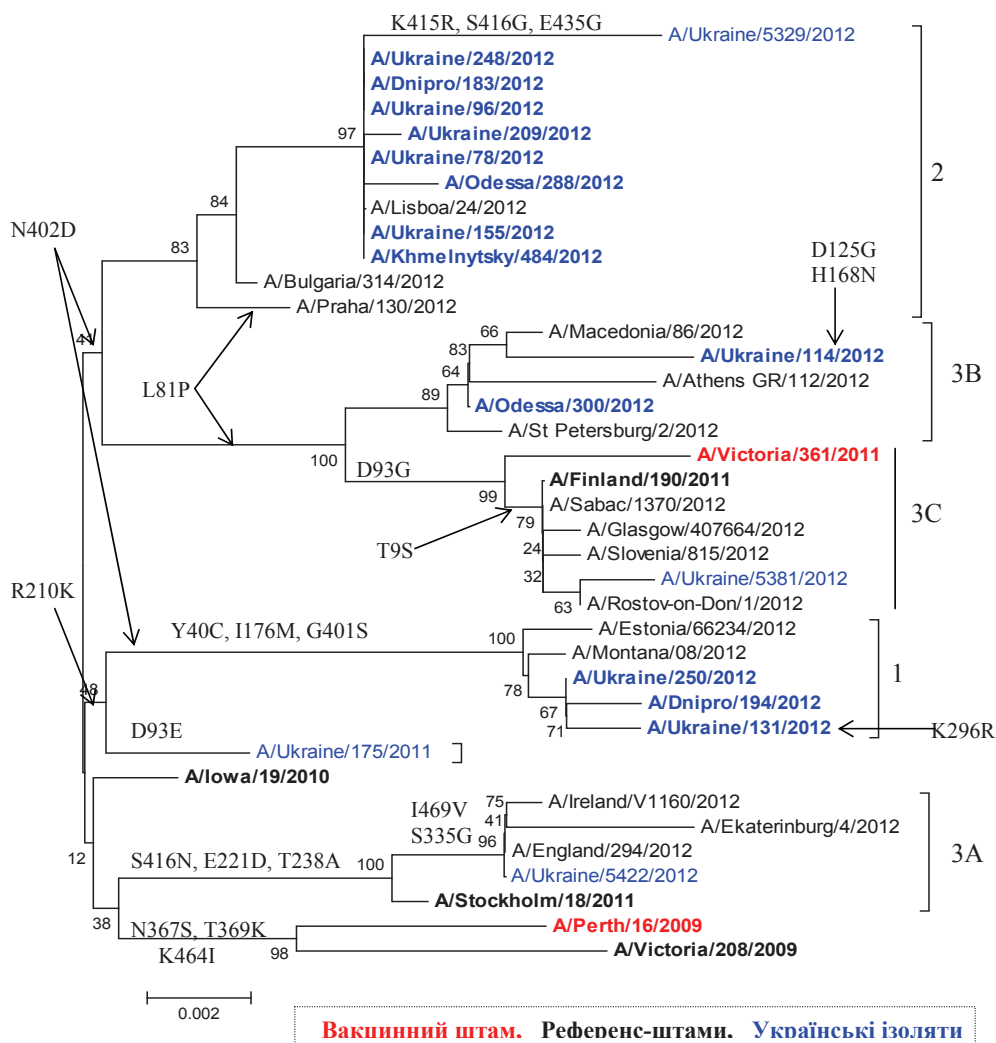


Рис. 2. Філогенетичний аналіз генів NA вірусів грипу A(H₃N₂) сезону 2011–2012 рр., проведений в програмі MEGA5. Еволюційна історія була відтворена методом NJ з 1000 бутстреп реплікацій. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу Kimura 2-parameter.

Fig. 2. Phylogenetic analysis of NA genes influenza A(H₃N₂) viruses, isolated in 2011–2012 season, conducted in MEGA5. Evolutionary history was reconstructed by NJ with 1000 BOOTSTRAP replications. Evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter.

ЗВ група об'єднала віруси, виділені в 2012 році, які спільно з групою ЗС селектували заміщення L81P. Сюди ввійшли досліджувані ізоляти А/Ukraine/114/12 та А/Odessa/300/12. Штам А/Ukraine/114/12 показав мутації D125G і H168N. Найбільш подібними до Київського штаму виявився вірус з Македонії. Одеський ізолят менш еволюціонував від батьківського штаму. З великою вірогідністю віруси другої групи були занесені до України неодноразово.

ЗС група включила новий вакцинний штам А/Victoria/361/11, референс-штам А/Finland/190/11 та ізоляти 2012 року, зокрема вірус з рутинного нагляду в Україні А/Ukraine/5381/12. Всі вони мали характерне заміщення D93G.

Таке різноманіття за генами нейрамінідази вірусів грипу, виділених в Україні, ще раз підтверджує їх множинне занесення на територію країни, з подальшим поширенням та набуттям нових генетичних змін.

Враховуючи важливість етіотропного лікування грипу, ми проаналізували АК послідовності нейрамінідази на присутність резистентних мутацій до оселтамівіру чи занамівіру [11, 14], і виявили, що всі досліджувані віруси грипу А(Н3N2), не показали жодного заміщення (E119V, E119V+I222V, R292K, N294S), яке призводить до появи резистентності до згаданих хіміопрепаратів.

Головним збудником епідемії грипу 2011–2012 років в Україні були віруси грипу типу А(Н3N2), які склали 99% усіх виділених вірусів грипу. За генетичними характеристиками поверхневих антигенів — HA та NA, віруси грипу А(Н3N2), виділені в Україні, розташувались в межах усіх п'яти генетичних груп кластеру Victoria/208. Всі виділені нами віруси грипу А(Н3N2) не селектували мутацій, з якими асоціюють появу резистентності до озельтамівіру і занамівіру. За результатами філогенетичного аналізу, в сезоні 2011–2012 рр. були виявлені множинні шляхи заносу епідемічних вірусів грипу А(Н3N2) до країни — як з Європи (в тому числі — Балтії), так і з Росії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Голубка О.С., Онищенко О.В., Міроненко А.П. Оцінка ефективності дозорного епіднагляду за грипом в Україні // Профілактична Медицина. — №4(16). — 2011. — С. 25–32.
2. Кумар Н.М. Молекулярная эволюция и филогенетика / Ней М. Кумар; [под ред. Г. В. Глазко]. — К.: КВШ. — 2004. — 333 с.
3. Лейбенко Л., Онищенко О., Голубка О., Бабій С., Міроненко А. Генетичний моніторинг циркулюючих в Україні вірусів грипу людей сезону 2010-2011 років // Вісник КНУ ім. Т.Шевченка. Біологія. — 2012. — 62. — С. 19–23.
4. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ Учебное пособие. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. — 2009. — 256 с.



5. *Bush R.M., Fitch W.M., Bender C.A., Cox N.J.* Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol Biol and Evol.* — 1999. — 16. — P. 1457–1465.

6. *Chen R., Holmes E.C.* Hitchhiking and the population genetic structure of avian influenza virus // *J.Mol.Evol.* — 2010. — 70. — P. 98–105.

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

8. *Das S.R., Hensley S.E., David A., Schmidt L., Gibbs J.S., Puigbm P., Ince W.L., Bennink J.R., Yewdell J.W.* Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2011. — 108, N 51. — E1417–E1422.

9. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* — 1985. — 39, N 4. — P. 783–791.

10. *Gamblin S.J., Skehel J.J.* Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins // *J Biol Chem.* — 2010. — 285, N 37.— P. 28403–28409.

11. *Gubareva L.V.* Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors // *Virus Research.* — 2004. — 103, N 1–2. — P. 199–203.

12. *Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *Journal of Molecular Evolution.* — 1980. — 16. — P. 111–120.

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

14. *Mishin V.P., Hayden F.G., Gubareva L.V.* Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2005. — 49, N 11. — P. 4515–4520.

15. *Oh D.Y., Barr I.G., Mosse J.A., Laurie K.L.* MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells // *J Clin Microbiol.* — 2008. — 46, N 7. — P. 2189–94.

16. *Okada J., Ohshima N., Kubota-Koketsu R. et al.* Localization of epitopes recognized by monoclonal antibodies that neutralized the H3N2 influenza viruses in man // *J Gen Virol.* — 2011. — 92 — P. 230–241.

17. *Plotkin J.B., Dushoff J., Levin S.A.* Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2002. — 99, N 9. — P. 6263–6268.

18. *Recommended* composition of influenza virus vaccines for use in the 2011–2012 northern hemisphere influenza season (available at: www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/recommendations_2011_12north/en/index.html).



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

20. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol Biol Evol*. — 2011. — 28, N 10. — P. 2731–2739.

21. Viboud C.C., Grais R.F., Lafont B.A., Miller M.A., Simonsen L. Multinational impact of the 1968 Hong Kong influenza pandemic: evidence for a smoldering pandemic // *J Infect Dis*. — 2005. — 192, N 2. — P. 233–48.

22. *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [King M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.]. — London: Academic Press. — 2011. — P. 749–758.

Стаття надійшла до редакції 04.03.2013 р.

Л.В. Лейбенко^{1, 2}, В.П. Полищук¹, Л.В. Радченко², А.П. Мироненко²

¹УНЦ «Институт биологии» Киевский национальный университет имени Т. Шевченко, ул. Владимирская, 64/13, Киев, Украина, 016012

²ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского» НАМН Украины, ул. Амосова, 5, Киев, Украина, 03680, тел.: +38 (044) 275 02 97, e-mail: leiblu@mail.ru

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ГРИППА ЛЮДЕЙ А(Н₃Н₂), ВЫДЕЛЕННЫХ В УКРАИНЕ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2011–2012 ГОДОВ

Реферат

Целью работы было провести генетический анализ сегментов, кодирующих гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) вирусов гриппа типа А(Н₃Н₂), выделенных в Украине в эпидемическом сезоне 2011–2012 годов. В данном исследовании были использованы методы: real-time RT-PCR, работа с культурой клеток MDCK-siat, секвенирования и филогенетический анализ. Проанализированы генетические сегменты НА и НА украинских изолятов вирусов гриппа А(Н₃Н₂) и построены соответствующие филогенетические деревья методом объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining) с использованием модели Kimura 2-parameter. Статистическая оценка филогенетического анализа проведена с использованием бутстреп-анализа (Bootstrap). Проанализировано генетическое сходство исследуемых изолятов к вакцинному штамму и вирусам выделенным в мире. Подробно проанализированы все генетические группы кластера Victoria/208, куда вошли выделенные нами изоляты. Описаны ключевые мутации в аминокислотных последовательностях НА и НА. Описаны ключевые мутации в аминокислотных последовательностях НА и НА.



В работе были выявлены множественные пути заноса эпидемических вирусов гриппа А(Н₃Н₂) в сезоне 2011–2012 гг. в Украину. Мутации в гемагглютинине украинских изолятов находились в высоковариабельных участках и не были связаны с изменением свойств вирусов. Анализ аминокислотных последовательностей NA показал отсутствие мутаций E119V, E119V + I222V, R292K и N294S, с которыми ассоциируют появление резистентности к озельтамивиру и занамивиру.

Ключевые слова: вирусы гриппа А (Н₃Н₂), нуклеотидные последовательности, филогенетический анализ.

L.V. Leibenko^{1,2}, V.P. Polischuk¹, L.V. Radchenko², A.P. Mironenko²

¹ESC “Institute of Biology” Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 016012

²L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases” NAMS of Ukraine
5, Amosova Str., Kyiv, Ukraine, 03680, tel.: +38 (044) 275 02 97, e-mail: leiblu@mail.ru

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HUMAN INFLUENZA VIRUSES A(H₃N₂), ISOLATED IN UKRAINE DURING THE 2011–2012 EPIDEMIC SEASON

Summary

Aim. To perform the phylogenetic analysis of segments, encodes hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) of A (H₃N₂) influenza viruses, isolated in Ukraine during the 2011–2012 epidemic season. **Methods.** In this study there were used the real-time polymerase chain reaction (real-time RT-PCR), sequencing and phylogenetic analysis methods. **Results.** The genetic segments HA and NA of Ukrainian influenza isolates of A (H₃N₂) influenza were analyzed. Appropriate phylogenetic trees were constructed by Neighbor-Joining method using the Kimura 2-parameter model. The statistical evaluation of phylogenetic analysis has been performed by using the bootstrap test (1000 replicates). The genetic similarity of ukrainian isolates, vaccine strain and viruses all over the world were analyzed. All genetic groups of Victoria/208 cluster included our isolates were described. The key mutations in amino acid sequences in HA and NA proteins were identified. **Conclusions.** The multiple ways of entering the epidemic strains of influenza A (H₃N₂) viruses 2011–2012 season in Ukraine were identified as well. The mutations in hemagglutinin of Ukrainian isolates were located in highly variable regions and weren't associated with significant changes in viruses. No selection of resistant mutations (E119V, E119V + I222V, R292K and N294S) to oseltamivir and zanamivir in NA proteins was observed.

Key words: A(H₃N₂) influenza viruses, nucleotide sequence, phylogenetic analysis.

