

## ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

**Давление отбора на ген нейраминидазы вирусов гриппа, выделенных в Украине с 2009 по 2015 гг.****С. В. Бабий, Л. В. Лейбенко<sup>\*</sup>, Л. В. Радченко, О. С. Голубка, Н. В. Тетерюк, А. П. Мироненко**

ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний имени Л. В. Громашевского» НАМН Украины, Киев, Украина

<sup>\*</sup>Для корреспонденции: Людмила Лейбенко, e-mail: liudmyla.leib@gmail.com**Ключевые слова:** вирусы гриппа, филогенетический анализ, генетическое разнообразие, давление отбора.**DOI:** 10.18527/2500-2236-2019-6-1-49-59

Получена 27 ноября 2019 г.

Принята к печати 20 декабря 2019 г.

Опубликована 30 декабря 2019 г.

**АННОТАЦИЯ**

Большое разнообразие существующих в природе антигенных вариантов вируса гриппа вызвано его быстрой эволюционной изменчивостью. Отбор жизнеспособных вариантов вируса гриппа происходит за счет естественного отбора. Лечение гриппозной инфекции с помощью современных противовирусных препаратов – ингибиторов нейраминидазы (NA) – приводит к возникновению мутаций в гене NA, которые ведут к появлению резистентности вирусов к данным препаратам. Цель работы состояла в определении давления отбора на белок NA вирусов гриппа, выделенных в Украине в период с 2009 по 2015 год. Основным методом оценки эволюционного давления на белки является определение количественного соотношения частот замен в несинонимических (dN) и синонимических сайтах (dS). С помощью этого метода мы показали, что лишь некоторые кодоны в гене NA были под влиянием положительного отбора: для вирусов гриппа типа А подтипа A(H1N1)pdm09 – сайт 40, для вирусов подтипа A(H3N2) – сайты 93 и 402, для вирусов гриппа типа В разновидности B/Yamagata – сайты 74, 99 и 268, и для вирусов разновидности B/Victoria – сайты 358, 288 и 455. Указанные сайты не связаны ни с активным центром NA, ни с трансмембранным доменом, ни с антигенными сайтами. Ингибиторы NA не являются селективным фактором отбора вирусов гриппа в Украине, поскольку, сайты, ассоциированные с резистентностью вирусов гриппа к ингибиторам NA, не попали под влияние положительного отбора, что, вероятно, объясняется низким уровнем применения данных противовирусных препаратов в Украине.

**The selection pressure on the neuraminidase gene of influenza viruses isolated in Ukraine from 2009 to 2015****Svetlana V. Babii, Liudmyla V. Leibenko<sup>\*</sup>, Larysa V. Radchenko, Olga S. Golubka, Nataliia V. Teteriuk, Alla P. Mironenko**

L. V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases, NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

<sup>\*</sup>Corresponding author: Liudmyla Leibenko, e-mail: liudmyla.leib@gmail.com**Keywords:** influenza viruses, phylogenetic analysis, genetic diversity, selection pressure**ABSTRACT**

A broad range of naturally occurring antigenic variants of the influenza virus is caused by its rapid evolutionary variability. The survival of viable influenza virus variants occurs through natural selection. Treatment of influenza infection with modern antiviral drugs – neuraminidase (NA) inhibitors – leads to occurrence of mutations in the NA gene, which result in emergence of virus resistance to these drugs. The goal of this study was to determine the selection pressure on the NA protein of influenza viruses isolated in Ukraine from 2009 to 2015. The main method for assessing the evolutionary pressure on proteins is to quantify the ratio of substitution rates at nonsynonymous (dN) and synonymous (dS) sites. With the help of this method we showed that only a few codons in the NA gene were under the positive selection resulting in mutations at the following sites: for influenza A viruses of A(H1N1)pdm09 subtype – site 40, for viruses of A(H3N2) subtype – sites 93 and 402, for B/Yamagata lineage viruses – sites 74, 99, and 268, and for the B/Victoria lineage viruses – sites 358, 288, and 455. These sites are not associated with NA active site, transmembrane domain, or the antigenic sites of this protein. We concluded that NA inhibitors are not a significant factor in the process of selection of the influenza viruses in Ukraine because sites associated with the resistance of influenza viruses to NA inhibitors were not affected by positive selection. This finding could be explained by the limited use of NA inhibitors for the treatment of influenza infections in Ukraine.

## ВВЕДЕНИЕ

Ежегодные циркуляции сезонного гриппа связаны с заболеваниями людей, которые по оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) могут стать причиной от 290000 до 650000 смертельных случаев в мире [1, 2]. Для вируса гриппа описано 4 типа: A, B, C и D, из которых только вирусы типов A и B вызывают сезонные эпидемии. В свою очередь вирусы гриппа A подразделяются на подтипы в зависимости от типа основных поверхностных белков вируса – гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). В настоящее время описано 18 подтипов HA (HA1 - HA18) и 11 – NA (N1 - N11), и только два из них – A(H1N1) и A(H3N2) – ответственны за сезонные эпидемии гриппа. Для вируса гриппа B выделяют две основные линии: B/Yamagata и B/Victoria. Большое разнообразие существующих в природе антигенных вариантов вируса гриппа вызвано его быстрой эволюционной изменчивостью [2, 3]. Высокая частота мутаций, возникающих в геноме вируса гриппа, представленном отрицательно полярной одноцепочечной сегментированной РНК, и отсутствие корректирующей активности у вирусной РНК-полимеразы приводят к возникновению большого количества мутаций, определяющих образование нового антигенного варианта. Это явление получило название антигенного дрейфа. Сегментированная структура генома вируса гриппа определяет возможность обмена фрагментами между штаммами одного типа, что приводит к возникновению новых вирусов и называется «антигенный шифт». Отбор жизнеспособных вариантов контролируется естественным отбором.

Основными лицензированными препаратами для профилактики и лечения гриппа А и В на сегодняшний день являются ингибиторы NA – занамивир, осельтамивир, ланинамивир и перамивир [4]. Механизм действия этих препаратов основан на блокировании функции вирусной NA, что, в свою очередь, ведет к ограничению распространения вируса в дыхательных путях [5]. Перамивир и ланинамивир отличаются более длительным действием, чем осельтамивир или занамивир [6, 7]. Однако лечение больных этими препаратами вызывает образование мутаций в гене NA, которые приводят к образованию и распространению вирусов, резистентных к их действию.

Анализ нуклеотидных последовательностей NA и NA вирусов, выделяемых от больных в разных точках земного шара, широко используется для прогнозирования эволюционной изменчивости вируса гриппа и предсказания появления новых эпидемических штаммов с помощью биоинформационических методов, в частности филогенетического анализа [8]. За последние годы филогенетический анализ стал одной из основных составляющих эпидемиологического надзора, с помощью которого определяют родство и эволюцию вирусов гриппа [9]. Несмотря на то, что сегодня существует много исследований давления отбора на гены вирусов гриппа человека, взаимосвязи между положительно отобранными сайтами,

антигенной вариабельностью вируса и чувствительностью к ингибиторам NA до сих пор не выяснены полностью [10-12].

Целью данной работы было определение давления отбора на ген NA вирусов гриппа, выделенных в Украине в период с 2009 по 2015 гг., и идентификация специфических мутаций в гене NA, ассоциированных с резистентностью к ингибиторам NA.

Основным методом оценки эволюционного давления на белки является определение количественного соотношения частот замен в несинонимических (dN) и синонимических сайтах (dS) [13,14]. Отношение dN/dS количественно определяет давление отбора путем сравнения скорости замен, которые, возможно, подвергаются селекции. Значение отношения  $dN/dS > 1$  в случае, если естественный отбор способствует закреплению изменений в последовательности белка, и  $dN/dS < 1$ , если естественный отбор подавляет изменения белка. При значении  $dN/dS$ , близком к 1, давление отбора отсутствует. С помощью данного метода мы изучили давление отбора на ген NA вирусов гриппа А человека подтипов A(H1N1) pdm09 и A(H3N2) и вирусов гриппа В двух основных разновидностей – B/Yamagata и B/Victoria, – выделенных в Украине в период 2009-2015 гг. Изучение давления отбора на ген NA не входило в рамки данного исследования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Вирусы

В работе были использованы изоляты вирусов гриппа эпидемических сезонов 2009-2015 гг. Образцы были получены от больных гриппоподобными заболеваниями (ГПЗ) и тяжелыми острыми респираторными инфекциями (ТОРИ) в виде мазков из носа, носоглотки или ротоглотки. В исследование были включены изоляты вирусов гриппа, полученные из дозорных центров Киева, Одессы, Днепра и Хмельницкого. Определение у пациентов случаев ТОРИ и ГПЗ проводили согласно критериям ВОЗ [15].

### Клеточные культуры

В исследовании была использована культура клеток Madin Darby canine kidney (MDCK), полученная из НИИ гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия). Из проб, положительных в ПЦР на вирус гриппа A(H3N2), изоляты выделяли на генетически модифицированной культуре клеток MDCK-SIAT1, полученной из Центров по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Атланта, США) [16].

### ОТ-ПЦР в реальном времени

Выделение РНК вирусов гриппа осуществляли с использованием коммерческого набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) методом, указанным

в инструкции производителя. Для постановки ПЦР готовили реакционную смесь по методике, рекомендованной CDC (Атланта, США) для выявления и исследования свиного и сезонных вирусов гриппа (версия 2009) [17]. Для постановки ПЦР использовали набор Ambion AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit и набор праймеров и зондов с двумя метками (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию проводили в 96-лучочной системе ПЦР Applied Biosystems real-time PCR 7500 (Thermo Fisher Scientific, США).

### Секвенирование генов вирусов гриппа

Секвенирование генов выделенных вирусов гриппа типа А подтипов A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) и гриппа типа В было проведено в Центре ВОЗ по гриппу в Лондоне (National Institute for Medical Research, NIMR, Лондон, Великобритания) и в CDC (Атланта, США) [18]. Все полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в международной базе данных Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID, <http://platform.gisaid.org/>).

### Филогенетический анализ

В исследование были включены последовательности NA вирусов гриппа эпидемических сезонов 2009–2015 гг. Всего было проанализировано 375 последовательностей. Из них 142 – последовательности вирусов гриппа типа А подтипа A(H1N1)pdm09, 110 – вирусов гриппа подтипа A(H3N2), 123 – вирусов гриппа типа В (94 – генетической линии В/Yamagata и 29 – генетической линии В/Victoria).

Для выявления мутаций проводили идентификацию и сравнение последовательностей с помощью BLAST-анализа (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для филогенетического анализа были отображены украинские и европейские изоляты, выделенные за исследуемый период, а также вакциновые и референс штаммы. Выравнивание последовательностей проводили с помощью алгоритма ClustalW [19]. Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) с

применением модели Tamura-92 (T92) с аппроксимацией индивидуальных частот сайтов гамма-распределением с бутстреп 1000 репликаций. Построение филогенетических деревьев осуществляли в программе MEGA6 [20, 21]. Финальные деревья были визуализированы с помощью программы FigTree 1.4.2 [22].

Трансляцию нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе MEGA6 для выявления аминокислотных замен, приводящих к резистентности в отношении ингибиторов NA: I117V, E119G/V, Q136K, Y155H, D198G, I222K/R/V, S246N/G, H274Y, N294S – для вирусов гриппа А подтипа A(H1N1)pdm09; E119I (V/D), Q136K, D151E/V I222L, R224K, E276D, R292K, N294S, R371K – для вирусов гриппа подтипа A(H3N2); E119A (G, V, A/D), R152K, D198E (N/Y), I222T (V/I), H274Y, R292K, N294S, R371K, G402S – для вирусов гриппа типа В. Нумерацию осуществляли по N2 [23].

### Методы исследования давления отбора

Поиск кодонов, находящихся под действием положительной селекции, был проведен на базе сервера Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>) [24, 25] с использованием нескольких методов: SLAC (single-likelihood ancestor), FEL (fixed-effects likelihood), IFEL (internal branch fixed-effects likelihood), входящих в пакет программ HyPhy сервера Datamonkey. Также были использованы методы FUBAR (fast unconstrained Bayesian approximation) и MEME (mixed-effects model of evolution). Соотношение dN/dS определяли с помощью HyPhy.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Вирусы гриппа A(H1N1)pdm09

В белке NA вирусов гриппа А подтипа A(H1N1)pdm09 были обнаружены мутации, находящиеся под давлением положительного отбора: L40V у четырех изолятов, выделенных в сезон 2012–2013 гг., и L40I в вирусах, циркулировавших в сезоны 2013–2014 и 2014–2015 гг. (Таблица 1, Рис. 1). Следует отметить,

Таблица 1. Результаты оценки эволюционного давления на аминокислотные последовательности NA вирусов гриппа

Тип/ Подтип вируса	dN/dS	Сайты, находящиеся под давлением отбора					
		положительного			отрицательного		
		Сайт	Мутация	Сезон, гг.	Всего сайтов	Сайты, изученные 4-мя методами*	
A(H1N1)pdm	0.261	40	L40V	2012–2013	27	2 сайта: 395, 439	
			L40I	2013–2015			
A(H3N2)	0.205	93	D93E	2010–2011	58	10 сайтов: 106, 107, 128, 182, 296, 306, 364, 427, 432, 449	
			D93G	2011–2012			
		402	N402D	2010–2011			
B/Yamagata	0.226	74	L74P	2014–2015	52	7 сайтов: 64, 83, 114, 173, 272, 329, 428	
		99	S99I			L83P	
		268	T268K				
B/Victoria	0.292	358	A358K	2011–2012	17	1 сайт: 371	
		288	E288Q	2010–2011			
		455	L455I				

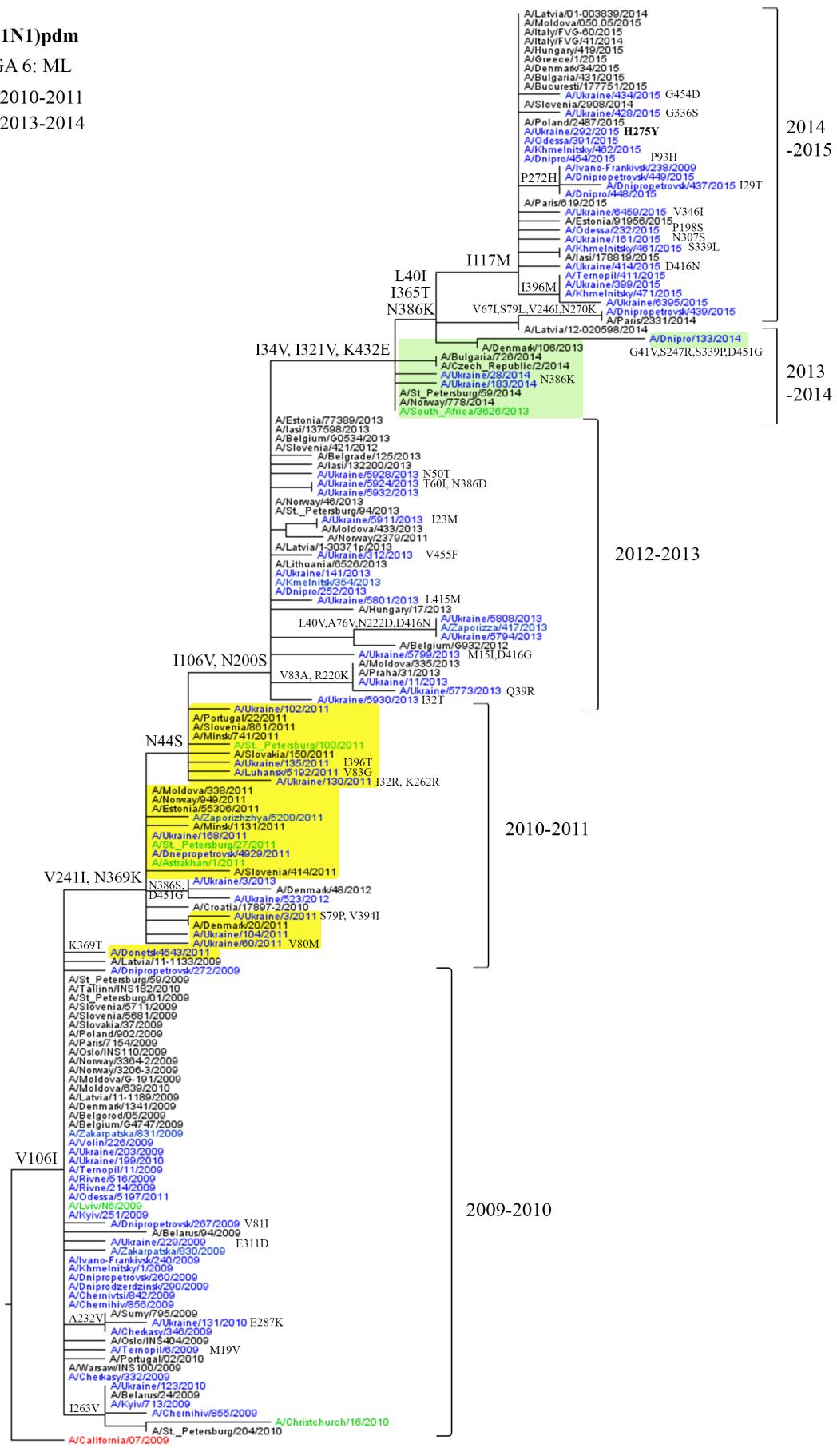
\*Сайты изучены методами SLAC, FEL, IFEL FUBAR

**A (H1N1)pdm**

MEGA 6: ML

■ - 2010-2011

■ - 2013-2014

**Рис. 1.** Филогенетическое дерево генов NA вирусов A(H1N1)pdm09.

Вирусы, выделенные в Украине, обозначены синим шрифтом (желтым отмечены вирусы сезона 2010-2011 гг., светло-зеленым – вирусы, выделенные в 2013-2014 гг.); вакцины обозначены красным шрифтом; референс штамм обозначен зеленым шрифтом.

что незначительное давление положительного отбора на пандемические вирусы гриппа также регистрировали другие авторы, хотя они определили другие сайты [12].

В результате филогенетического анализа гена NA вирусов гриппа подтипа A(H1N1)pdm09 был выявлен высокий уровень генетического родства, равный 99%. Все украинские вирусы гриппа были подобны вирусу A/California/07/2009, использованному для приготовления вакцинного штамма.

Хотя украинские изоляты подтипа A(H1N1)pdm09 приобрели уникальные мутации, большинство аминокислотных замен было расположено в тех же сайтах, что и у изолятов, выделенных в соседних странах [26-31]. Например, все украинские изоляты эпидемического сезона 2014-2015 гг. содержали характерную замену I117M и были подобны изолятам, выделенным в таких европейских странах, как Италия, Латвия, Польша, Словакия, Франция и Эстония. Аналогичные вирусы были выделены и в Новой Зеландии [32]. Эти результаты свидетельствуют о том, что изменения, произошедшие в гене NA, не привели к значительным изменениям антигенных свойств NA вирусов гриппа данного подтипа.

### Вирусы гриппа A(H3N2)

Для вирусов гриппа A(H3N2) хотя бы одним из методов (FEL, IFEL FUBAR,) было обнаружено два сайта: 93 и 402, находящихся под давлением положительного отбора (Таблица 1).

Украинский изолят A/Ukraine/175/2011 приобрел мутации D93E и D402N и был близок изолятам, выделенным в Беларуси и Эстонии, а также украинским изолятам, выделенным в следующем эпидемическом сезоне. В следующем сезоне замена D93E наблюдалась только у одного изолята A/Ukraine/5381/2012. Однако в сезон 2012-2013 гг. снова выделилась группа изолятов с заменой D93G. Таким образом, мутация D93E появилась в популяции украинских вирусов гриппа сезона 2010-2011 гг., а в следующем сезоне (2011-2012 гг.) в этом положении наблюдали уже другую аминокислоту (G), но мутация D93G все же закрепилась в популяции украинских вирусов гриппа в сезон 2012-2013 гг. (Рис. 2). Belanov с соавторами охарактеризовали мутацию D93G как один из эволюционных маркеров вирусов гриппа подтипа A(H3N2) [33]. Начиная с сезона 2012-2013 гг., данная мутация присутствовала и в вирусе, использованном для получения вакцинного штамма.

При исследовании последовательностей вирусов, представленных в доступных базах данных (Influenza Virus Resource, IVR и GISAID), была определена еще одна замена, T267K, рассматриваемая как эволюционный маркер, которая наблюдалась у некоторых украинских изолятов, выделенных в сезон 2014-2015 гг.

В результате филогенетического анализа вирусов гриппа A(H3N2) был выявлен высокий уровень генетического родства этих вирусов, равный 98.3%.

Стоит отметить, что в сезон 2013-2014 гг. от одного человека через небольшой промежуток времени было выделено два изолята подтипа A(H3N2) – A/Ukraine/710/2013 и A/Ukraine/728/2013, – которые отличались только одной заменой G401D в гене NA. Аминокислота в этом положении входит в состав антигенного сайта NA [34].

### Вирусы гриппа типа В генетической линии B/Yamagata

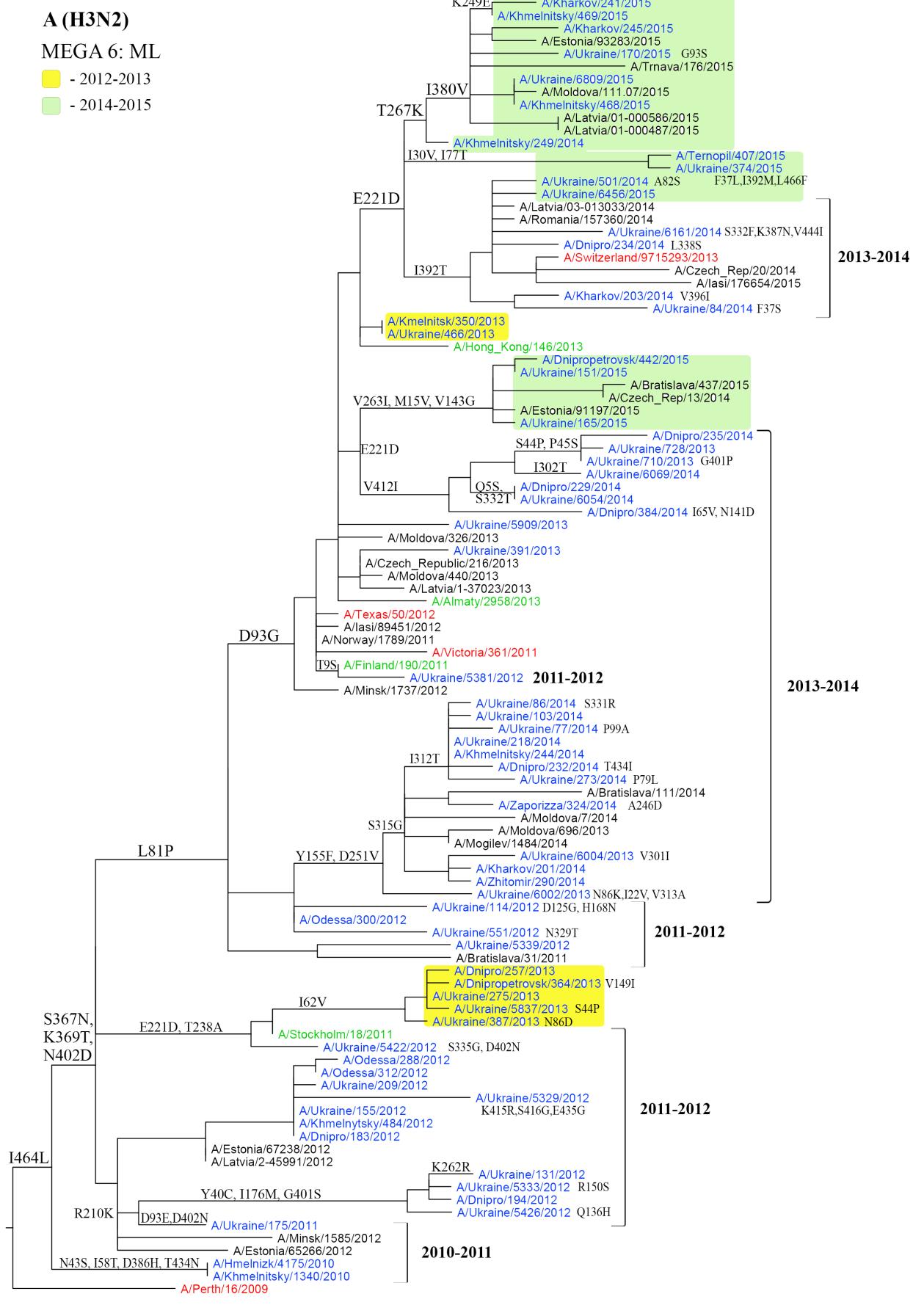
В ходе исследования вирусов гриппа типа В генетической ветви B/Yamagata под действием давления положительного отбора было обнаружено три сайта: 74, 99, 268 (Таблица 1). Замены T268K, S99I и L74P наблюдались только среди изолятов сезона 2014-2015 гг. При этом изоляты с заменой L74P выделились на филогенетическом дереве в отдельную группу (Рис. 3).

Филогенетический анализ гена NA вирусов гриппа B/Yamagata за исследуемый период показал их высокое генетическое родство, равное 97.5%. Вирусы гриппа, выделенные в Украине за исследуемый период, были подобны вирусам, рекомендованным для приготовления вакцинных штаммов в данном эпидемическом сезоне.

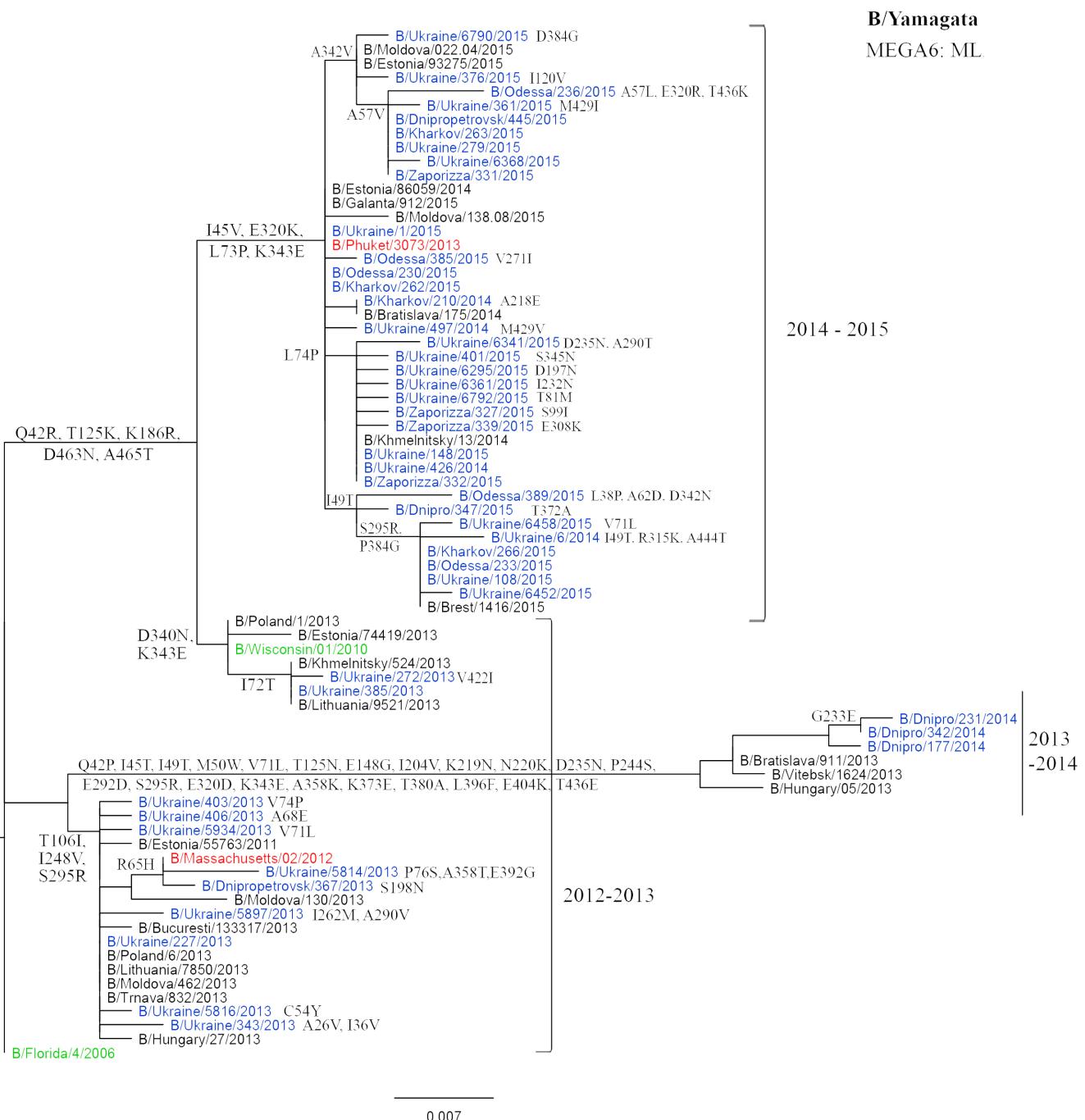
Также были обнаружены замены, которые теоретически могут влиять на конформацию NA белка. Некоторые украинские изоляты содержали замену в потенциальном сайте гликозилирования (A465T) или в ножке NA (R65H). Кроме того, были обнаружены замены в сайтах T125K и V71L (петля-120). В вирусах, выделенных в сезон 2013-2014 гг., были обнаружены аминокислотные замены T125K, E148G (петля-150) и D235N (спираль-190) [26]. По данным Центра ВОЗ по гриппу в Лондоне [27], некоторые вирусы гриппа, выделенные в этот сезон, содержали индивидуальные замены, не характерные для украинских изолятов в этом сезоне, а именно T46I, A55T, G70R, E77A, I262T, R295H, A358T и K382R.

### Вирусы гриппа типа В генетической ветви B/Victoria

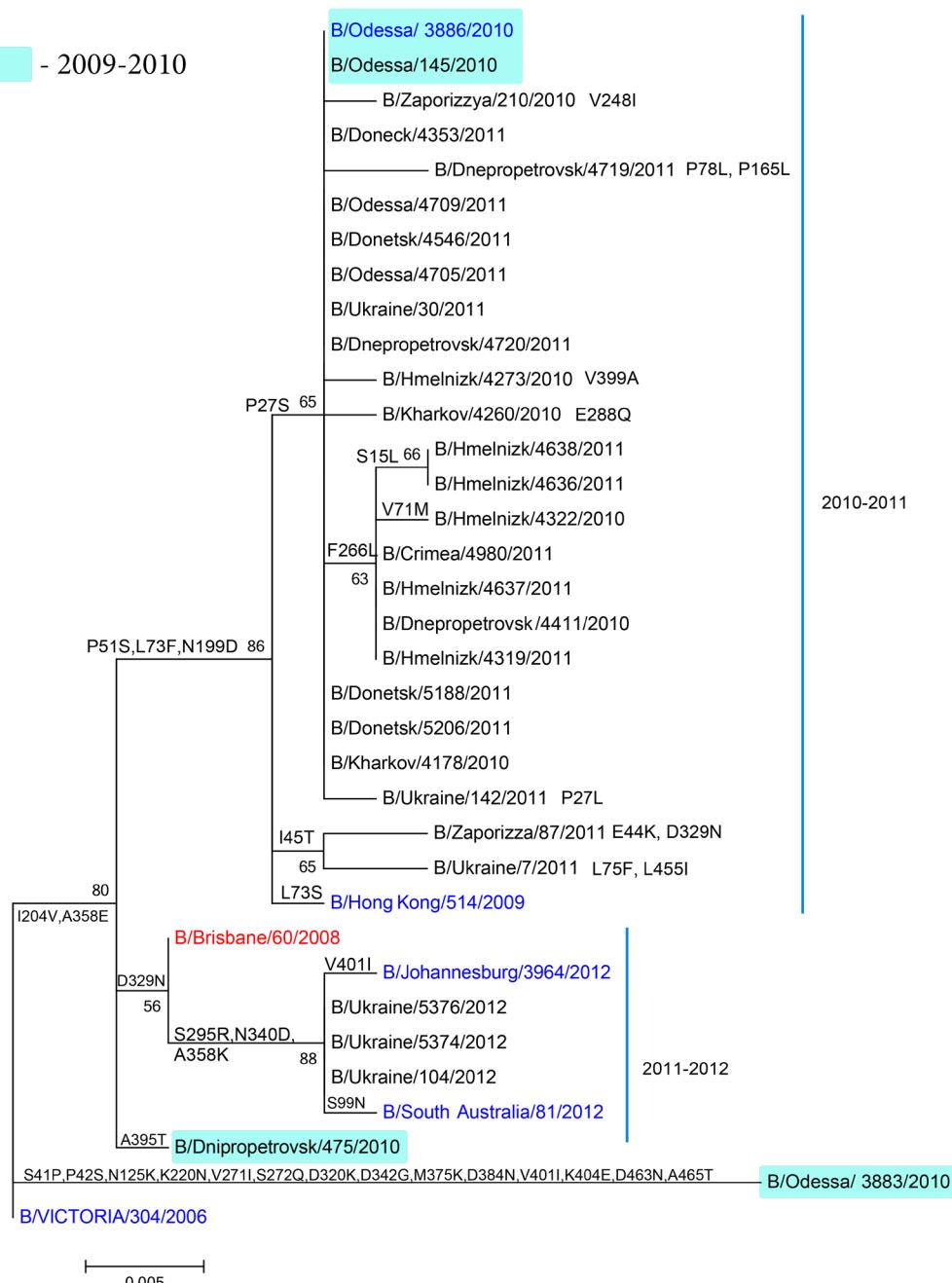
Для вирусов гриппа типа В генетической линии B/Victoria в ходе исследования были обнаружены сайты 358, а также 288 и 455 (IFEL, MEME), подверженные положительному отбору (Таблица 1). В некоторых из этих положений в украинских изолятах, циркулировавших в эпидемический сезон 2010-2011 гг., были обнаружены лишь единичные мутации E288Q и L455I (Рис. 4). Однако мутация A358K, которая появилась в вирусах, циркулировавших в сезон 2011-2012 гг., наблюдалась у всех изолятов вирусов гриппа типа В генетической линии B/Victoria. Этот результат свидетельствует о том, что данная замена закрепилась в популяции вирусов гриппа в результате давления положительного отбора. При филогенетическом сравнении генов NA изолятов линии B/Victoria был определен высокий уровень генетического родства, равный 98.4%.

**Рис. 2.** Филогенетическое дерево генов NA вирусов А(H3N2).

Вирусы, выделенные в Украине, обозначены синим шрифтом (желтым отмечены вирусы сезона 2010-2011 гг., светло-зеленым – вирусы, выделенные в 2013-2014 гг.); вакцинный штамм обозначен красным шрифтом; референс штамм обозначен зеленым шрифтом.

**Рис. 3.** Филогенетическое дерево генов NA вирусов гриппа B/Yamagata.

Вирусы, выделенные в Украине, обозначены синим шрифтом; вакцины штамм обозначен красным шрифтом; референс штамм обозначен зеленым шрифтом.

**Рис. 4.** Филогенетическое дерево генов NA вирусов гриппа B/Victoria.

Вирусы, выделенные в Украине, обозначены синим шрифтом; вакцинальный штамм обозначен красным шрифтом. Голубым отмечены штаммы 2009-2010 гг.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Постепенное накопление мутаций в гене приводит к изменению структуры кодируемого белка, что, в свою очередь, может привести к изменению биологических свойств вируса, таких как скорость распространения, тяжесть вызываемого заболевания, контагиозность, чувствительность к препаратам и т. п. [2]. Исследование случаев и механизмов молекулярной адаптации вируса гриппа является одной из фундаментальных задач эволюционной биологии. Несинонимические мутации закрепляются в популяции чаще, чем синонимические. Когда новые мутации обеспечивают определенные преимущества для

белка (вируса), тогда они имеют большую вероятность фиксации. Это явление регулярно наблюдается при эволюции РНК-содержащих вирусов и ведет к изменению поверхностных антигенов вируса гриппа – НА и НА.

В данной работе представлены результаты впервые проведенного в Украине исследования давления отбора на вариабельность белка NA вирусов гриппа человека и появление устойчивости к ингибиторам NA. Изучение последовательностей NA вирусов, выделенных в Украине в период с 2009 по 2015 гг., показало, что отношение dN/dS составило 0.261 для NA

вирусов гриппа А подтипа A(H1N1)pdm09, 0.205 для NA вирусов подтипа A(H3N2), 0.226 для NA вирусов типа В линии B/Yamagata и 0.292 для NA вирусов линии B/Victoria. Полученные данные свидетельствуют о том, что в этих генах количество синонимических замен преобладает над количеством несинонимических на каждый сайт. То есть, большинство позиций не находятся под действием положительного отбора.

Определенные в данном исследовании значения отношения dN/dS для NA вирусов гриппа разных типов и подтипов хорошо согласуются с данными других авторов. Так, при исследовании NA вирусов гриппа подтипа A(H3N2), выделенных в Германии, отношение dN/dS было равно 0.22 [35], и аналогичное значение было получено при исследовании 1397 вирусов подтипа A(H1N1)pdm09 в Китае [12]. Для вирусов гриппа В линии B/Yamagata при анализе 98 последовательностей NA вирусов, выделенных в Бангкоке, dN/dS было равно 0.20 [36].

Мы установили, что только отдельные сайты в гене NA оказались под давлением положительного отбора: сайт 40 для вирусов гриппа А подтипа A(H1N1) pdm09, сайты 93 и 402 для вирусов гриппа подтипа A(H3N2), сайты 74, 99 и 268 для вирусов гриппа типа В генетической линии B/Yamagata и сайты 358, 288 и 455 для вирусов генетической линии B/Victoria. Указанные сайты не относятся к активному центру, трансмембранныму домену или антигенным сайтам NA. Однако в результате давления отбора мутации в этих положениях закреплялись в популяции вирусов гриппа и эти вирусы часто формировали отдельную ветвь на филогенетическом дереве. Результаты подтверждены изучением сайтов разными методами. Среди вирусов гриппа В линии B/Yamagata обнаружен один изолят B/Odessa/389/2015 с мутацией L83P. Эта мутация не закрепилась, так как в популяции вирусов гриппа В сезона 2017-2018 гг. она уже не наблюдалась.

Лечение гриппа ингибиторами NA может создавать селективное давление на появление резистентности у вирусов к этим препаратам, что может влиять и на генетическое разнообразие вирусной популяции. Появление резистентности вирусов к противовирусным препаратам является важной проблемой

здравоохранения. В ходе нашего исследования не было выявлено давления на сайты, ассоциированные с резистентностью к ингибиторам NA. Таким образом, в Украине ингибиторы NA не являются селективным фактором отбора вирусов гриппа. По-видимому, это объясняется тем, что ингибиторы NA не нашли широкого применения для лечения гриппа в Украине. Однако эти исследования нуждаются в продолжении.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось при поддержке и в сотрудничестве с Центром ВОЗ по гриппу в Лондоне (National Institute for Medical Research, NIMR, Лондон, Великобритания) и Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC, Атланта, США), где были секвенированы изоляты вирусов гриппа, выделенные в Украине.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

## ЦИТИРОВАНИЕ

Бабий СВ, Лейбенко ЛВ, Радченко ЛВ, Голубка ОС, Тетерюк НВ, Мироненко АП. Давление отбора на ген нейраминидазы вирусов гриппа, выделенных в Украине с 2009 по 2015 гг. MIR J 2019; 6(1), 49-59. doi: 10.18527/2500-2236-2019-6-1-49-59.

## АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2019 Лейбенко и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Influenza Burden of disease. Available: [https://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/bod/en/](https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/bod/en/)
2. Chow EJ, Doyle JD, Uyeki TM. Influenza virus-related critical illness: prevention, diagnosis, treatment. Crit Care. 2019; 23(1), 214. doi: 10.1186/s13054-019-2491-9.
3. Lazniewski M, Dawson WK, Szczeplinska T, Plewczynski D. The structural variability of the influenza A hemagglutinin receptor-binding site. Brief Funct Genomics. 2018; 17(6), 415-27. doi: 10.1093/bfgp/elx042.
4. Shie JJ, Fang JM. Development of effective anti-influenza drugs: congeners and conjugates – a review. J Biomed Sci. 2019; 26(1), 84. doi: 10.1186/s12929-019-0567-0.
5. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. N Engl J Med. 2005; 353(13), 1363-73. doi: 10.1056/NEJMra050740.
6. Bantia S, Arnold CS, Parker CD, Upshaw R, Chand P. Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection. Antiviral Res. 2006; 69(1), 39-45. doi: 10.1016/j.antiviral.2005.10.002.

7. Ishizuka H, Yoshiba S, Okabe H, Yoshihara K. Clinical pharmacokinetics of laninamivir, a novel long-acting neuraminidase inhibitor, after single and multiple inhaled doses of its prodrug, CS-8958, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2010; 50(11), 1319-29. doi: 10.1177/0091270009356297.
8. Timofeeva TA, Asatryan MN, Altstein AD, Narodisky BS, Gintsburg AL, Kaverin NV. Predicting the Evolutionary Variability of the Influenza A Virus. *Acta Naturae.* 2017; 9(3), 48-54. PubMed PMID: 29104775.
9. Sunagawa S, Iha Y, Taira K, Okano S, Kinjo T, Higa F, et al. An Epidemiological Analysis of Summer Influenza Epidemics in Okinawa. *Intern Med.* 2016; 55(24), 3579-84. doi: 10.2169/internalmedicine.55.7107.
10. Shen J, Ma J, Wang Q. Evolutionary trends of A(H1N1) influenza virus hemagglutinin since 1918. *PLoS One.* 2009; 4(11), e7789. doi: 10.1371/journal.pone.0007789.
11. Janies DA, Voronkin IO, Studer J, Hardman J, Alexandrov BB, Treseder TW, et al. Selection for resistance to oseltamivir in seasonal and pandemic H1N1 influenza and widespread co-circulation of the lineages. *Int J Health Geogr.* 2010; 9, 13. doi: 10.1186/1476-072X-9-13.
12. Li W, Shi W, Qiao H, Ho SY, Luo A, Zhang Y, et al. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses. *Virol J.* 2011; 8, 183. doi: 10.1186/1743-422X-8-183.
13. Yang Z, Bielawski JP. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol.* 2000; 15(12), 496-503. doi: 10.1016/s0169-5347(00)01994-7.
14. Poon AF, Frost SD, Pond SL. Detecting signatures of selection from DNA sequences using Datammonkey. *Methods Mol Biol.* 2009; 537, 163-83. doi: 10.1007/978-1-59745-251-9\_8.
15. Kalil AC, Thomas PG. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Crit Care.* 2019; 23(1), 258. doi: 10.1186/s13054-019-2539-x.
16. Zholobak NM, Mironenko AP, Shcherbakov AB, Shydlovska OA, Spivak MY, Radchenko LV, et al. Cerium dioxide nanoparticles increase immunogenicity of the influenza vaccine. *Antiviral Res.* 2016; 127, 1-9. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.12.013.
17. Baselga-Moreno V, Trushakova S, McNeil S, Sominina A, Nunes MC, Draganescu A, et al. Influenza epidemiology and influenza vaccine effectiveness during the 2016-2017 season in the Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN). *BMC Public Health.* 2019; 19(1), 487. doi: 10.1186/s12889-019-6713-5.
18. Shu B, Wu KH, Emery S, Villanueva J, Johnson R, Guthrie E, et al. Design and performance of the CDC real-time reverse transcriptase PCR swine flu panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(7), 2614-9. doi: 10.1128/JCM.02636-10.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28(10), 2731-9. doi: 10.1093/molbev/msr121.
20. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12), 2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197.
21. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(4), 406-25. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
22. Rambaut A. FigTree. 2014. v.1.4.2: tree drawing tool. [Accessed 16 Jun 2015]. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
23. Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther.* 2012; 17, 159-73. doi: 10.3851/IMP2067.
24. Delport W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky Pond SL. Datammonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics.* 2010; 26(19), 2455-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btq429.
25. Kosakovsky Pond SL, Frost SD. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol.* 2005; 22(5), 1208-22. doi: 10.1093/molbev/msi105.
26. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere, 23rd – 25th September 2013 // WHO Influenza Centre, London. Available: <https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/nimr-report-sep2013final.pdf>
27. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2015/16, 23rd – 25th February 2015 // WHO Influenza Centre, London. Available: <https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/nimr-report-feb2015-web.pdf>
28. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere, 22 – 24 September 2014// WHO Influenza Centre, London. Available: <https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/nimr-vcm-report-sep-14-web.pdf>
29. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere, September 2010 // WHO Influenza Centre, London. Available: <https://www.crick.ac.uk/partnerships/worldwide-influenza-centre/annual-and-interim-reports>
30. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere, 26th – 30th September 2011 // WHO Influenza Centre, London. Available: <https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/interim-report-sep-2011.pdf>
31. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the

- Southern Hemisphere, 17th – 19th September 2012 // WHO Influenza Centre, London. Available: [https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/interim\\_report\\_september\\_2012\\_2.pdf](https://www.crick.ac.uk/sites/default/files/2018-07/interim_report_september_2012_2.pdf)
32. Influenza Surveillance in New Zealand 2014 // Institute of Environmental Science and Research Ltd (ESR): Wellington, New Zealand, 18 June 2015, p. 95. Available: [https://surv.esr.cri.nz/PDF\\_surveillance/Virology/FluAnnRpt/InfluenzaAnn2014.pdf](https://surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/Virology/FluAnnRpt/InfluenzaAnn2014.pdf)
33. Belanov SS, Bychkov D, Benner C, Ripatti S, Ojala T, Kankainen M, et al. Genome-Wide Analysis of Evolutionary Markers of Human Influenza A(H1N1) pdm09 and A(H3N2) Viruses May Guide Selection of Vaccine Strain Candidates. *Genome Biol Evol.* 2015; 7(12), 3472-83. doi: 10.1093/gbe/evv240.
34. Agrawal AS, Sarkar M, Ghosh S, Roy T, Chakrabarti S, Lal R, et al. Genetic characterization of circulating seasonal Influenza A viruses (2005-2009) revealed introduction of oseltamivir resistant H1N1 strains during 2009 in eastern India. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(8), 1188-98. doi: 10.1016/j.meegid.2010.07.019.
35. Mostafa A, Abdelwhab el SM, Slanina H, Hussein MA, Kuznetsova I, Schuttler CG, et al. Phylogenetic analysis of human influenza A/H3N2 viruses isolated in 2015 in Germany indicates significant genetic divergence from vaccine strains. *Arch Virol.* 2016; 161(6), 1505-15. doi: 10.1007/s00705-016-2815-x.
36. Horthongkham N, Athipanyasilp N, Pattama A, Kaewnapan B, Sornprasert S, Srisurapanont S, et al. Epidemiological, Clinical and Virological Characteristics of Influenza B Virus from Patients at the Hospital Tertiary Care Units in Bangkok during 2011-2014. *PLoS One.* 2016; 11(7), e0158244. doi: 10.1371/journal.pone.0158244.