*БОЯЛЬСЬКА ОКСАНА ГЕННАДІЇВНА. Назва дисертаційної роботи: "ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ГРІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ ГРИПУ ПІД ЧАС ЕПІДЕМІЙ В ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ "*

*МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ*

*КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ*

*імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА*

*На правах рукопису*

*Бояльська Оксана Геннадіївна*

*УДК: 575.86 + 578.832.1*

*ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ГРІ ТА МОЛЕКУЛЯРНОБІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ ГРИПУ*

*ПІД ЧАС ЕПІДЕМІЙ В ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ*

*03.00.06 - вірусологія*

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук*

*Науковий керівник:*

*доктор біологічних наук, професор*

*Будзанівська І. Г.*

*Київ - 2016*

*2*

*ЗМІСТ*

*Стор*

*ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ 4*

*ВСТУП 5*

*РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ, ЩО*

*ВИКЛИКАЮТЬ ГРВІ*

*12*

*1.1 Загальна характеристика респіраторних вірусів 12*

*1.2 Характеристика родини Orthomyxoviridae 14*

*1.3 Історичні аспекти відомих пандемій ХХ та ХХІ століття 15*

*1.4 Організація геному вірусу грипу 22*

*1.5 Реплікація геному вірусу грипу 24*

*1.6 Білковий склад та антигени вірусу грипу 26*

*1.7 Механізми еволюції вірусів грипу 34*

*1.8 Лабораторна діагностика грипу 35*

*1.9 Філогенетичний аналіз для вивчення вірусів грипу 40*

*РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 43*

*2.1 Матеріали досліджень 43*

*2.2 Методи досліджень 43*

*2.2.1 Виявлення вірусів грипу типів А та В за допомогою панелі*

*праймерів та зондів (Biosearch) методом ПЛР у реальному часі*

*43*

*2.2.2 Виявлення інших збудників ГРВІ за допомогою набору «ОРВИ -*

*скрин» (Амплисенс, Россия)*

*57*

*2.2.3 Ізоляція виявлених вірусів грипу на культурі клітин MDCK та*

*MDCK-SIAT*

*60*

*2.2.4 Визначення типоспецифічності ізольованих вірусів методом*

*РГГА*

*63*

*2.2.5 Побудова філогенетичних дерев за допомогою програми*

*MEGA 6.0*

*65*

*2.2.6 Статистична обробка результатів 66*

*3*

*РОЗДІЛ 3 РЕТРОСПЕКТИВНИЙ АНАЛІЗ ЗАХВОРЮВАНОСТІ НА*

*ГРИП ТА ІНШІ ГРІ НАСЕЛЕННЯ ЖИТОМИРСЬКОЇ ОБЛАСТІ ЗА*

*ПЕРІОД З 1999 ДО 2015 РР.*

*67*

*3.1 Аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ населення Житомирської*

*області*

*67*

*3.2 Порівняльний аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ населення*

*Житомирської області в розрізі районів*

*71*

*РОЗДІЛ 4 МОНІТОРИНГ ВІРУСІВ ГРИПУ ТА ІНШИХ ЗБУДНИКІВ*

*ГРВІ, ЯКІ БУЛИ ПОШИРЕНІ В ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ*

*ПРОТЯГОМ 2009-2015 РР.*

*77*

*4.1 Виявлення вірусів грипу типів А та В методом ПЛР у реальному*

*часі*

*77*

*4.2 Виявлення збудників інших ГРВІ методом ПЛР у реальному часі 83*

*РОЗДІЛ 5 ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ,*

*ВИДІЛЕНИХ У ЖИТОМИРСЬКІЙ ОБЛАСТІ ЗА ПЕРІОД З 2009 ДО*

*2015 РР.*

*88*

*5.1 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу А(H1N1)pdm,*

*які циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.*

*88*

*5.2 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу А(H3N2), які*

*циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.*

*94*

*5.3 Порівняльний філогенетичний аналіз вірусів грипу В, які*

*циркулювали в Житомирській області протягом 2009-2015 рр.*

*102*

*УЗАГАЛЬНЕННЯ 110*

*ВИСНОВКИ 125*

*СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 127*

*4*

*ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ*

*АГ - антиген;*

*аз - амінокислотні залишки;*

*ВООЗ - Всесвітня організація охорони здоров’я;*

*ГРІ - гострі респіраторні інфекції;*

*ГРВЗ - гостре респіраторне вірусне захворювання;*

*ЗТ-ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією;*

*ІФН - інтерферон;*

*ІФА - імуноферментний аналіз;*

*ІХА - імунохроматографічний метод;*

*МФА - метод флуоресцируючих антитіл;*

*НК - нуклеїнова кислота;*

*нз - нуклеотидні залишки;*

*Об/хв - обертів за хвилину;*

*Од/мл - одиниць на 1 мл;*

*ПААГ - поліакриламідний гель;*

*РС- вірус - респіраторно-синцитіальний вірус;*

*РЛА - реакція латекс-аглютинації;*

*РГА - реакція гемаглютинації;*

*РГГА - реакція гальмування гемаглютинації;*

*РНК - рибонуклеїнова кислота;*

*мРНК - матрична рибонуклеїнова кислота;*

*кРНК - повні комплементарні транскрипти;*

*пре-мРНК - попередник матричної РНК;*

*РЦР - ранні цитокінові реакції;*

*РЗК - реакція зв’язування комплементу;*

*РН - реакція нейтралізації;*

*HA - гемаглютинін;*

*NA - нейрамінідаза.*

*5*

*ВСТУП*

*Актуальність. Грип та інші гострі респіраторні інфекції (ГРІ) займають*

*перше місце за частотою та кількістю випадків захворювань у світі [1]. В*

*Україні щорічно на грип та ГРІ хворіють 10-14 млн осіб, що становить 25-30%*

*усієї та близько 75-90% інфекційної захворюваності в країні [2].*

*До 95% респіраторних інфекцій мають вірусну природу. Вони*

*зумовлюють високі рівні захворюваності та смертності, особливо в людей*

*похилого віку і в групах високого ризику, немовлят, дітей, а також в осіб з*

*ослабленим імунітетом та людей з хронічними хворобами [3, 4, 5]. Відомо*

*більше ніж 200 вірусів, які здатні викликати ураження респіраторного тракту.*

*До найбільш розповсюджених збудників гострих респіраторних вірусних*

*інфекцій (ГРВІ) відносять віруси грипу, парагрипу, респіраторносинцитіальний вірус, аденовіруси, риновіруси, метапневмовіруси,*

*коронавіруси, ентеровіруси та бокавіруси [1]. Сезонні підйоми захворюваності*

*на грип та інші ГРІ характеризуються змішаною етіологією, у яких частка*

*грипу превалює [2].*

*Вірус грипу є основним респіраторним вірусом, який може призвести до*

*чисельної кількості випадків госпіталізації та смертей [6]. Віруси грипу*

*викликають щорічні епідемії та разом з іншими ГРІ уражують 5-15% населення*

*у всьому світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ)*

*щорічно у всьому світі реєструється 3-5 млн важких випадків грипу і*

*250000-500000 смертей від нього [7]. Віруси грипу – збудники, які мають*

*здатність викликати пандемії. Пандемії виникають кожні 11-40 років та*

*звичайно протікають хвилеподібно й можуть продовжуватись до 1,5-2 років,*

*іноді – з охопленням за 9-10 місяців до 30% населення земної кулі [2, 8].*

*Найтяжчою в історії людства була пандемія вірусу грипу A(H1N1), так*

*званий «Іспанський грип» 1918-1919 рр. [9]. Остання пандемія та перша у*

*ХХІ ст. виникла у 2009 р. та була викликана вірусом грипу A(H1N1)pdm, який*

*являв собою вірус-реасортант, що утворився з вірусів грипу людини, птахів та*

*6*

*свиней. Набуття цим вірусом властивості передаватися від людини до людини*

*через повітря призвело до швидкого поширення серед людей у країнах різних*

*континентів [10].*

*Усі пандемії були викликані різними серотипами вірусу грипу типу А.*

*Висока мінливість вірусу грипу зумовлена, по-перше, фрагментарною*

*структурою геному вірусу, а також унікальними антигенними властивостями*

*двох поверхневих глікопротеїнів: гемаглютиніну (HA) і нейрамінідази (NA).*

*Віруси грипу типу А більш мінливі, ніж віруси грипу В та С [11]. Змінюючи*

*склад своїх поверхневих антигенів з високою еволюційною швидкістю, віруси*

*грипу мають можливість ухилитися від дії імунної системи, при цьому*

*зберігаючись у популяції людини [12].*

*Висока мінливість вірусів грипу призводить до необхідності робити*

*порівняння антигенних і біологічних властивостей вірусів грипу під час*

*епідемій [12]. Спостереження і контроль за антигенними властивостями*

*циркулюючих серед населення вірусів грипу щороку необхідні для визначення*

*нового варіанта штаму для включення його до складу вакцини [14, 15].*

*У даний час в людській популяції циркулюють підтипи вірусу грипу А*

*(H1N1) і (H3N2) та грипу В [16]. Поширеність цих трьох вірусів грипу може*

*змінюватися за часом або географічно усередині країни, між країнами і*

*континентами протягом одного сезону грипу [17].*

*Отже, моніторинг інтенсивності епідемічного процесу та циркуляції*

*вірусів грипу та інших ГРІ на окремих територіях країни є одним з*

*пріоритетних напрямків епідеміологічного і вірусологічного нагляду та*

*наукових досліджень, що дозволить оперативно оцінювати ситуацію і*

*проводити профілактичні (протиепідемічні) заходи.*

*Вдалою моделлю для дослідження епідеміологічного профілю ГРІ та*

*філогенетичного аналізу вірусів грипу можна використати Житомирську*

*область, яка на своїй території має добре розвинені транспортні магістралі, як*

*залізничні, так і автомобільні, які з'єднують з центральною, східною та*

*південною частинами України, а також з країнами Східної та Центральної*

*7*

*Європи. Внаслідок цього вірус грипу може швидко потрапляти до*

*Житомирської області з території інших областей та країн.*

*Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.*

*Дисертаційна робота виконана в межах технічного завдання держбюджетної*

*теми № 11БФ 036-02 «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження*

*стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням*

*біоінформаційних технологій» кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології»*

*Київського національного університету імені Тараса Шевченка*

*(номер держреєстрації 0111U004649). Також пов’язана з роботами, виконаними*

*у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології*

*та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України»: шифр 133,*

*«Розробити програму етіологічного прогнозування епідемій грипу в Україні»*

*2014-2016 рр. виконання (номер держреєстрації: 0114U000383); шифр 122,*

*«Філогенетичний аналіз вірусів грипу та напрямок їх еволюції» 2011-2013 рр.*

*виконання (номер держреєстрації: 0111U002013).*

*Мета та завдання дослідження. Дослідити епідеміологічний профіль*

*ГРІ за період з 1999 до 2015 рр. та провести філогенетичний аналіз вірусів*

*грипу, які циркулювали протягом 2009-2015 рр.*

*Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі завдання:*

*1. Провести ретроспективний аналіз захворюваності на грип та інші ГРІ*

*серед населення Житомирської області за період з 1999 до 2015 рр.*

*2. Визначити етіологічну структуру популяції вірусів грипу в Житомирській*

*області протягом 2009-2015 рр.*

*3. Вивчити поширення вірусів грипу серед різних груп населення в*

*епідемічних сезонах 2009-2015 рр.*

*4. Провести диференційну діагностику грипу та інших ГРВІ молекулярногенетичним методом.*

*5. Виділити та накопичити на чутливій культурі клітин MDCK віруси грипу,*

*що циркулювали протягом 2009-2015 рр. для проведення сиквенування.*

*8*

*6. Провести філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей*

*поверхневих антигенів вірусів грипу для виявлення еволюційних змін.*

*7. Дослідити нуклеотидні та амінокислотні послідовності генів*

*гемаглютиніну та нейрамінідази сиквенованих вірусів грипу і виявити в*

*них мутації.*

*Об’єкт дослідження: епідемічний процес ГРІ в Житомирській області,*

*генетична мінливість вірусів грипу.*

*Предмет дослідження: захворюваність на грип та інші ГРІ, молекулярногенетична характеристика вірусів грипу типів А та В.*

*Методи дослідження: для виконання поставлених завдань у роботі*

*використано епідеміологічний, вірусологічний, серологічний, молекулярногенетичний, статистичний методи дослідження.*

*Наукова новизна одержаних результатів.*

*Вперше показано, що захворюваність на грип населення Житомирської*

*області та України в цілому протягом 17 календарних років має тенденцію до*

*зниження.*

*Захворюваність на інші ГРІ населення Житомирської області, як і*

*України в цілому, на відміну від захворюваності на грип, реєструється*

*протягом всього календарного року.*

*Виявлено особливість етіологічної структури популяцій вірусів грипу в*

*Житомирській області протягом 2009-2015 рр., яка відрізняється від України та*

*інших країн Європи та світу. Вірус грипу А(H1N1)pdm на території*

*Житомирської області виявлявся у чотирьох, вірус грипу А(H3N2) – в трьох,*

*вірус грипу В – в двох епідемічних сезонах.*

*Вперше, на прикладі двох епідемічних сезонів протягом 2009-2015 рр.*

*показано моноциркуляцію штамів вірусів грипу (епідемічні сезони*

*2012-2013 рр. (А(H1N1)pdm) та 2013-2014 рр. (A(H3N2)), в порівнянні з*

*Україною та іншими країнами Європи та світу, де в даних епідемічних сезонах*

*спостерігалась ко-циркуляція всіх трьох штамів вірусів грипу.*

*9*

*Завдяки проведенню філогенетичного аналізу методом максимальної*

*правдоподібності показано еволюційні зміни в послідовностях генів*

*гемаглютиніну та нейрамінідази сиквенованих вірусів грипу за період з 2009 до*

*2015 рр.*

*Практичне значення одержаних результатів.*

*На прикладі Житомирської області показано, що проведення*

*епідеміологічного та вірусологічного нагляду за грипом на високому рівні з*

*використанням сучасних лабораторних методів забезпечує необхідною*

*інформацією управлінські структури, що дозволяє вчасно реагувати на появу*

*нових вірусів, в тому числі – з можливими пандемічними потенціалами.*

*Отримані результати доповнюють інформацію про дослідження*

*властивостей вірусів грипу, циркулюючих в Україні в цілому, що дозволило*

*ідентифікувати й оцінити положення виділених штамів на глобальному рівні.*

*Дана інформація буде повною та більш коректною, якщо такі дані будуть*

*отримані з кожної області України. Це, своєю чергою, потрібно для відбору*

*кандидатів до складу протигрипозної вакцини.*

*Комплексне застосування тест-систем на грип та інші респіраторні*

*патогени показали доцільність використання диференційної діагностики грипу*

*та інших ГРВІ на підставі проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР),*

*зокрема для прийняття рішення лікарями щодо необхідності використання для*

*лікування хворих інгібіторів нейрамінідази.*

*Результати досліджень використані при внесенні даних України у дві*

*системи нагляду за грипом: Європейську систему TESSY (Flu News Europe) та*

*всесвітню мережу ВООЗ – FluNet, що забезпечило більш повну подачу*

*інформації щодо відображення епідемічної ситуації в нашій країні.*

*Особистий внесок здобувача.*

*Дисертація є самостійною роботою автора. Розробка плану експерименту*

*та її реалізація, отримання експериментальних даних, їх узагальнення,*

*інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом академіка НААН,*

*10*

*д.б.н., проф. А. Л. Бойка; д.б.н., проф. І. Г. Будзанівської;*

*д.мед.н. А. П. Міроненко.*

*Автором вивчено особливості епідеміологічного процесу грипу в*

*Житомирській області за період з 1999 до 2015 рр. разом із заступником*

*начальника Головного управління Держсанепідслужби України в*

*Житомирській області Киричуком І. М.*

*Лабораторна диференційна діагностика грипу та інших ГРВІ методом*

*ПЛР у реальному часі була проведена у вірусологічній лабораторії ДУ*

*«Житомирський обласний лабораторний центр Держсанепідслужби України»*

*самостійно.*

*Виділення вірусів грипу на чутливій культурі клітин, проведення*

*штамової ідентифікації виділених житомирських ізолятів проводились у відділі*

*респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та*

*інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України».*

*Філогенетичний аналіз вірусів грипу, що циркулювали в Житомирській*

*області за період з 2009 до 2015 рр., проведений автором особисто на кафедрі*

*вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету*

*імені Тараса Шевченка.*

*Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної*

*роботи оприлюднені та обговорені на засіданнях кафедри вірусології ННЦ*

*«Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса*

*Шевченка (щопівроку); конференції, присвяченій 50-річчю кафедри вірусології*

*«Вірусологія: минуле, сьогодення, майбутнє» (Київ, 12 квітня 2012);*

*VII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, 10-13 вересня*

*2013); V Науково-практичній конференції «Біологічні дослідження - 2015»*

*(Житомир, 11-12 березня 2015); Міжнародній конференції для молодих вчених*

*«Сучасні проблеми мікробіології та біотехнології» (Одеса, 1-4 червня 2015);*

*Міжнародній конференції молодих вчених CYS-2015 (Київ, 21-25 вересня*

*2015).*

*11*

*Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 наукових праць у*

*фахових наукових виданнях (з них 1 у виданні, що входить до міжнародної бази*

*даних Scopus) та 5 тез наукових конференцій (3 – міжнародні).*

*Структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 145 сторінках і*

*складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, 3 розділів*

*власних досліджень та їх обговорення, узагальнення отриманих результатів,*

*висновків. Список літератури включає 165 джерел. Дисертація ілюстрована 28*

*рисунками та 6 таблицями.*

ВИСНОВКИ

Удисертаційнійроботівирішеноважливутаактуальнунауковопрактичнупроблему–задопомогоюепідеміологічноготавірусологічного

наглядудослідженоінтенсивністьтаетіологічнічинникиепідемічногопроцесу

грипутаіншихГРІвЖитомирськійобластіатакожгенетичнізміниякі

відбулисяуциркулюючихвірусахгрипущодозволитьоперативнооцінювати

ситуаціюіпроводитипрофілактичніпротиепідемічнізаходи

Основнірезультатинаданіувисновках

ЗахворюваністьнагрипнаселенняЖитомирськоїобластітаУкраїнив

ціломупротягомкалендарнихроківмаєтенденціюдозниження

Виявленаособливістьетіологічноїструктурипопуляціївірусівгрипув

Житомирськійобластіпротягомррякавідрізняєтьсявід

УкраїнитаіншихкраїнЄвропитасвітуВірусгрипуАна

територіїЖитомирськоїобластівиявлявсяучотирьохвірусгрипу

А–втрьохвірусгрипуВ–удвохепідемічнихсезонах

ПроведенадиференційнадіагностикаГРВІметодомПЛРуреальному

часіпоказалащопідчасепідемійгрипусереднаселенняЖитомирської

областікрімвірусівгрипувиявлялисьіншіреспіраторнівірусиасаме

аденовірусикоронавірусиобохгрупта

метапневмовіруситариновірусиВисокийвідсотоквиявлених

негативнихзразківпов’язанийзтимщодоступнідовикористання

діагностичнінабориздатнівиявлятилишенайбільшпоширенізбудники

ГРВІ

Ізолятивірусівгрипучотирьохепідемічнихсезонів

суттєвихмутаційвгенахповерхневихбілківвірусівненабулиВсі

досліджуваніізолятизалишалисьантигенноподібнимидовакцинного

штамущопідтвердженофілогенетичним

аналізом



ВірусигрипуАйнадалічіткоутримуютьсявлюдськійпопуляції

задопомогоюантигенногодрейфуякийвідбуваєтьсявгенах

поверхневихантигеніввірусуТакізолятиепідемічногосезону

ррбулибільшподібнідовакцинногоштаму

авжеізолятинаступногоепідемічногосезонуантигенноподібнідо

новоговакцинногоштаму

ВиявленощонавідмінувідширокогорозповсюдженнявірусівгрипуВ

двохгенетичнихгілокусвітівЖитомирськійобластіврізних

епідемічнихсезонахрртаррвиявлялисьвіруси

грипуВрізнихгенетичнихгілокПоказанощоізолятисезону

ррєбільшподібнимидореференсштаму

Ізолятисезонуррвиявилисьбільшподібними

доновоговакцинногоштамуепідемічногосезонурр

ніждовакцинногоштамуданогоепідемічногосезону

рр

Впершенаприкладідвохепідемічнихсезонівпротягомрр

показаномоноциркуляціюштаміввірусівгрипуепідемічнісезони

ррАтаррхочаврізних

країнахсвітувданихепідемічнихсезонахспостерігаласькоциркуляція

всіхтрьохштаміввірусівгрипу