

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Копылова Нина Вадимовна

Антигенные свойства нейраминидазы подтипа N9

Выпускная квалификационная работа бакалавра
по направлению подготовки Биология
основная образовательная программа бакалавриата Биология

Работа выполнена в ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины»,
отдел вирусологии
Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
кафедры фундаментальных проблем
медицины и медицинских технологий
факультета стоматологии СПбГУ, ведущий
научный сотрудник отдела вирусологии
ФГБНУ "Институт экспериментальной
медицины», Дешева Юлия Андреевна

Санкт-Петербург
2023

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- ВОЗ — всемирная организация здравоохранения
- НА — нейраминидаза
- НА — гемагглютинин
- ЖГВ — живая гриппозная вакцина
- РКЭ — развивающиеся куриные эмбрионы
- ФСБ — фосфатно-солевой буфер
- ЭИД50 — 50%-ая эмбриональная инфекционная доза
- RDE — receptor destroying enzyme
- РТГА — реакция торможения гемагглютинации
- БСА — бычий сывороточный альбумин
- ТМВ — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин
- LPIAV — низкопатогенный вирус птичьего гриппа
- RNP — рибонуклеопротеин
- HPiAV — высокопатогенный вирус птичьего гриппа
- NER — белок ядерного экспорта
- M1 — матриксный белок 1
- M2 — матриксный белок 2
- SA — сиаловая кислота
- ГАЕ — гемагглютинирующая единица
- NS — неструктурный белок ядерной локализации
- PB1, PB2, PA — РНК-зависимые РНК полимеразы
- МАТ — моноклональные антитела
- Me — медиана
- Q1 — верхняя квартиль
- Q3 — нижняя квартиль

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГРИППА А	7
1.1.1 Структурно-функциональная организация вириона вируса гриппа	7
1.1.2 Структурная организация генома вируса гриппа А	8
1.1.3 Репродукция вируса гриппа А	10
1.2 АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА	12
1.2.1 Структура гемагглютинина (НА)	12
1.2.2 Структура нейраминидазы (NA)	15
Строение головного домена	16
Строение стеблевого домена	20
Лекарственная устойчивость	22
1.3 ЭВОЛЮЦИЯ И АНТИГЕННЫЙ ДРЕЙФ H7N9	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1 МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
Аминокислотные последовательности	31
Штаммы вируса гриппа	31
Куриные эмбрионы	31
Исследуемые образцы сывороток крови волонтеров	31
2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.2.1 Эволюционный анализ последовательностей аминокислот NA	32
2.2.2 Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах	32
2.2.3 Концентрирование и очистка вируса в ступенчатом градиенте сахарозы	32
2.2.4 Обработка сывороток крови	33
2.2.5 Постановка реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА)	33
2.2.6 Изучение нейраминидазной активности вирусов гриппа	34
2.2.7 Статистическая обработка данных	34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1 Филогенетический анализ нейраминидазы вирусов H7N9,	36
выделенных в период 2013-2017г	36
3.2 Оценка ферментативной активности NA H7N9, выделенных в 2013 и 2017 гг.	38
.....	38
3.3 Изучение иммуногенности ЖГВ на основе вирусов A/H7N9, выделенных в 2013 и 2017 гг.	39
3.3 Изучение защитной эффективности моноклональных антител (мАТ)	40
к N9-13 против инфекции вирусом A/H7N9-17	40
ВЫВОДЫ	42
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	43

ВВЕДЕНИЕ

Грипп является социально значимой инфекцией, ежегодно наносящей значительный ущерб здоровью населения и экономике страны. Возбудитель гриппа обладает высокой изменчивостью, периодически появляются пандемически опасные вирусы ранее не циркулировавших среди людей подтипов. На текущий момент в качестве пандемической угрозы всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) рассматриваются высоко- и низкопатогенные штаммы вируса гриппа птиц подтипов H5, H7 и H9, получившие широкое территориальное распространение и ассоциированные со спорадическими инфекциями у людей.

В Китае в марте 2013 года у пациентов с лихорадкой и тяжелым поражением нижних дыхательных путей был идентифицирован реассортантный низкопатогенный вирус птичьего гриппа H7N9. Этот вирус неоднократно вызывал инфицирование людей, приводящее к осложнениям, включающих полиорганную недостаточность и острый респираторный синдром. Так, в период с марта 2013 г. по июль 2017 года в Китае было зарегистрировано более 1550 лабораторно подтвержденных случаев заражения человека вирусом птичьего гриппа A H7N9, при этом летальность составила примерно 39% [61]. В двух случаях инфекция вирусом гриппа птиц A(H7N9) была диагностирована на территории Канады, у путешественников, возвратившихся из Китая в январе 2015 года.

С момента появления низкопатогенного вируса птичьего гриппа A H7N9 было зарегистрировано пять эпидемических волн [62]. При этом, пятая волна характеризуется более широким ареалом распространения, а также значительным увеличением случаев заболеваний среди людей. Что еще более важно, после эволюционных изменений в пятую волну, в конце 2016 года, появились высокопатогенные вирусы птичьего гриппа H7N9 [70].

Предположительно источником заражения послужила инфицированная домашняя птица и контаминированная окружающая среда, прежде всего птичьи рынки. Не исключается и передача вируса от человека к человеку по крайней мере в 17 выявленных кластерах, состоявших из 2-3 членов семьи. На сегодняшний день все штаммы вирусов H7N9 по-прежнему ограничены птичьими резервуарами и не способны к устойчивой трансмиссии среди человеческой популяции.

Однако, недооценивать пандемический потенциал вирусов гриппа H7N9 и совсем исключать возможность передачи вируса от человека к человеку нельзя. Так, было продемонстрировано, что отдельные человеческие изоляты LPIAV H7N9 способны к передаче воздушно-капельным путем у хорьков [70]. Также было показано, что новый новый HPIAV H7N9, в отличие от LP H7N9, способен эффективно реплицироваться в утках, приводя их к

летальному исходу и способствуя тем самым распространению вируса. Кроме того, у высоко- и низкопатогенных вирусов H7N9 были обнаружены мутации, связанные с приобретением лекарственной устойчивости к основным противовирусным препаратам, и ряд аминокислотных замен, увеличивающих тропизм к рецепторам человека.

В случае возникновения пандемической ситуации возможности химиотерапевтических средств могут оказаться ограниченными необходимостью массового многократного применения, а также устойчивостью к ним пандемических штаммов. Наиболее эффективный способ борьбы с гриппом - вакцинопрофилактика. В связи с чем, актуальным научно-практическим направлением является создание международных и государственных коллекций вакцинных штаммов вируса гриппа потенциально пандемических подтипов, прошедших все надлежащие стадии доклинических/клинических испытаний и продемонстрировавших высокую иммуногенность. Созданный резерв позволит в случае необходимости в кратчайшие сроки начать производство вакцинных препаратов и масштабную иммунизацию населения.

Изменения патогенности и вирулентности вирусов H7N9 были связаны с потенциальными мутациями в антигенах структурах: вирусных гликопротеинов гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Большая часть исследований была направлена на рецепторы HA, тогда как работ, посвященных, молекулярным изменениям нейраминидазы было гораздо меньше. Тем не менее, было продемонстрировано, что некоторые аминокислотные замены в NA предшествовали изменениям в HA и способствовали увеличению патогенности и вирулентности H7N9.

Есть свидетельства о том, что частота нуклеотидных замен штаммов H7N9 за период 2018–2019 гг. увеличилась в несколько раз, по сравнению с изолятами пятой волны, что свидетельствует о быстрой мутации высокопатогенного вируса гриппа. Это означает, вирусы H7N9 продолжают эволюционировать как генетически, так и антигенно. В связи с этим, одной из приоритетных задач ВОЗ является подготовка к пандемии гриппа A(H7N9), которая включает в себя создание коллекций вакцинных штаммов с целью скорейшего начала производства вакцины и иммунизации населения в случае пандемической угрозы A(H7N9) и оценку степени восприимчивости населения к потенциально пандемическому штамму вируса гриппа A(H7N9). Первый этап подготовки подразумевает всестороннюю, полную характеристику иммуногенности и защитной эффективности вакцинных препаратов потенциально пандемического подтипа, в том числе с применением методов выявления гуморального иммунного ответа к NA вируса гриппа. Второй этап включает исследование гетеросубтипического противогриппозного иммунитета, опосредованного целым рядом

факторов: антигемагглютинирующими и антинейраминидазными антителами, Т-клетками памяти и т.д.

Целью данной работы было изучение и сравнений антигенных свойств NA вирусов А/Н7N9, выделенных до и после 2016 года

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Проведение молекулярно-генетический анализ вирусов Н7N9, выделенных за период 2013-2017 гг.

2) Проведение ферментативный анализ и оценить активность NA в вирусах Н7N9 2013 и 2017 года.

3) Изучение иммуногенности ЖГВ на основе вирусов А/Н7N9, выделенных в 2013 и 2017 гг.

4) Изучения защитной эффективности моноклональных антител к N9-13 против инфекции вирусом А/Н7N9-17.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика вируса гриппа А

1.1.1 Структурно-функциональная организация вириона вируса гриппа

Вирусы гриппа входят в семейство Orthomyxoviridae, которое включает в себя 9 родов: Alphainfluenzavirus, Betainfluenzavirus, Gammmainfluenzavirus, Deltainfluenzavirus, Isavirus, Mykissvirus, Quaranjavirus, Sardinovirus, Thogotovirus. Члены этого семейства - это оболочечные РНК-содержащие вирусы с одноцепочечным сегментированным минус-нитевым геномом [1]. В зависимости от антигенной специфичности внутренних структурных компонентов вириона выделяют три рода вирусов гриппа: А, В и С.

Вирусы гриппа А характеризуются высокой инфекционностью и являются более вирулентными патогенными человека. Вирионы гриппа А имеют сферическую форму диаметром от 80 до 120 нм, в результате отпочкования также могут образовываться нитевидные вирионы до нескольких микрон в длину, особенно это характерно для свежих изолятов [72].

Вирионы окружены мембранной оболочкой, в основе которой находится фрагмент билипидного слоя клетки хозяина. Его липидный состав соответствует рафт-микродоменам, содержащим холестерол, гликолипиды, сфинголипиды и белковые рецепторы.

В оболочку вируса гидрофобным концом погружено примерно 600 рецепторных белков, шипов двух видов – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). Вирусы гриппа А подразделяется на сероподтипы в соответствии с антигенными характеристиками НА и НА. Так на сегодняшний день вирусы гриппа А включают 18 сероподтипов НА и 11 сероподтипов НА [95].

Молекула гемагглютинина состоит из трех гомологичных субъединиц; адсорбируясь на остатках силовых кислот в составе мембранных гликопротеинов, НА способствует слиянию вирусной мембраны с мембраной эндосомы, тем самым обеспечивая проникновение вируса в клетку. Молекула НА имеют грибовидную форму и состоят из тетрамеров гликозилированного белка НА, за счет ферментативной активности которого происходит отщепление остатков силовых кислот от мембранных гликопротеинов, что способствует отпочковыванию вирусного потомства.

В состав оболочки вируса гриппа А интегрировано также несколько тетрамеров матричного белка М2. Это минорный компонент вирусной частицы, который образует

протонный насос, обеспечивая условия для депротеинизации вируса при проникновении в клетку и выходе из нее [2].

Цитоплазматические хвосты белков НА, NA, М2 закорены в матричном белке М1, который обеспечивает связующую функцию между оболочкой и расположенными внутри вириона структурами ядра: белком ядерного экспорта (NEP, также называемого неструктурным белком 2, NS2) и комплексом рибонуклеопротеинов (RNP), который состоит из сегментов вирусной РНК, покрытых нуклеопротеином (NP), и гетеротримерной РНК-зависимой РНК полимеразы, состоящей из субъединиц щелочных белков PB2, PB1 и кислого белка PA [3].

NEP выполняет несколько функций в жизненном цикле вируса. Он обеспечивает экспорт потомства сегментов вирусной РНК из ядра в цитоплазму и к клеточной мембране, где в дальнейшем происходит сборка вирусной частицы [73]. NEP принимает участие в регуляции уровня транскрипции и репликации вирусной нуклеиновой кислоты, а также обеспечивает переключение клеточной АТФазы на эффективное почкование вирионов. Регуляция уровня транскрипции и репликации вирусной РНК является одним из важных факторов адаптации высокопатогенных вирусов птичьего гриппа к млекопитающим [4].

1.1.2 Структурная организация генома вируса гриппа А

Геном вируса гриппа А содержит восемь сегментов одноцепочечной минус-нитевой РНК, ssРНК(-) (Рисунок 1), стабилизированной РНК-связанным «ядерным» белком (NP), и полимеразного комплекса (белки PB1, PB2 и PA). Сегменты имеют разную длину в зависимости от размера молекулы РНК. На 3'-конце и 5'-конце каждого сегмента содержатся взаимно комплементарные последовательности, за счет которых образуются большие шпильки, и РНК скручивается в винтовую структуру с петлей на длительном конце [72]. РНК-полимеразные комплексы присоединяются к основанию каждой такой шпильки, так что комплементарные концы пар оснований выступают в роли промоторов для транскрипции и репликации вирусной РНК для этих комплексов. Некодируемые участки включают сигнал для полиаденилирования мРНК и фрагмент сигнала для сборки вируса [75].

Отдельные сегменты кодируют один или несколько структурных и неструктурных белков. Три самых больших сегмента РНК (1–3, 5) кодируют вирусные полимеразы PB1, PB2 и PA, которые участвуют в синтезе и репликации РНК внутри хозяйской клетки. Сегменты 4 и 6 РНК кодируют вирусные гликопротеины гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (NA) соответственно. Сегмент 7 кодирует матричный белок М1, М2 также экспрессируется из сегмента 7 путем сплайсинга РНК [4].

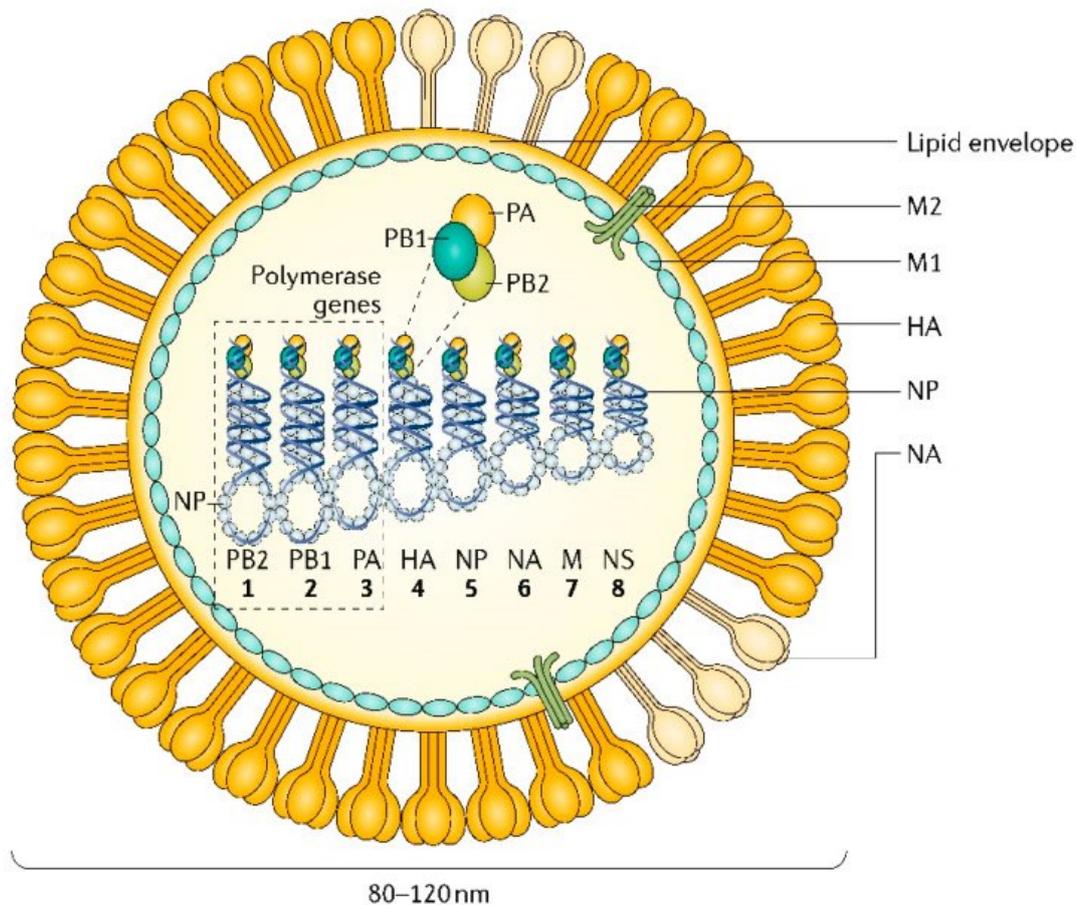


Рисунок 1. Схематическое изображение вируса гриппа А и его генома [3]

С сегмента 8 экспрессируется белок NS1, который является антагонистом интерферона, ограничивает его продукцию и играет важную роль в ограничении иммунного ответа, а также участвует в модуляции репликации вирусной и NP/NS2.

Сегментированная природа генома вируса гриппа делает возможной рекомбинацию, то есть обмен сегментами геномной РНК, при коинфицировании клетки вирусами гриппа одного типа. Рекомбинация генома вируса гриппа может привести к антигенному сдвигу, при котором полученный вирус может продуцировать новые антигенные белки, для которых ранее не существовало иммунитета. Смешение вирусных геномов увеличивает вирусное разнообразие.

Формированию вирусного разнообразия также способствует плохая корректирующая способность РНК-полимеразы вируса [5]. Молекулярным изменениям в вирусном геноме посредством аминокислотных замен, делеций или вставок приводят к относительно незначительным изменениям в антигенных сайтах на белках-мишенях, эти изменения могут

накапливаться со временем и в конечном итоге продуцировать штамм, который больше не распознается антителами хозяина [2]. Иногда антигенные сдвиги могут привести к возникновению совершенно нового вирусного штамма, тли как в случае с вирусом А/Н7N9 антигенный дрейф может значительно изменить патогенность и вирулентность человека.

1.1.3 Репродукция вируса гриппа А

Вирусы гриппа А циркулирует не только среди людей, но и среди домашних животных, свиней, лошадей и домашней птицы (включая кур, индеек, уток и гусей) [6]. Однако, основным резервуаром вирусов гриппа признаны дикие виды водоплавающих птиц [8]. Эти животные-резервуары обеспечивают источник антигенно разнообразных генов НА и NA, которые могут обмениваться между вирусными штаммами путем реассортации после коинфицирования одного и того же хозяина, увеличивая тем самым разнообразие вирусов.

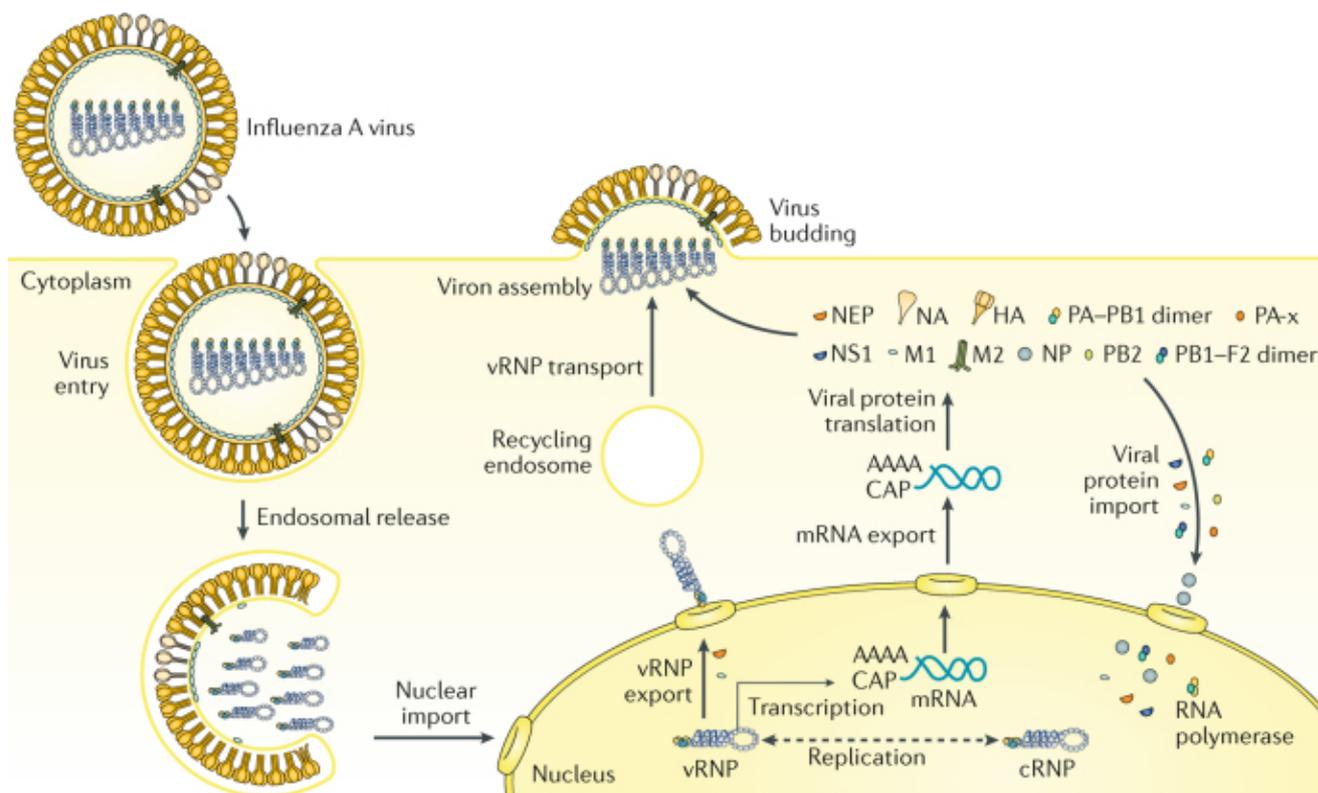


Рисунок 2. Жизненный цикл вируса гриппа [3]

На клеточном уровне репликация вируса гриппа в основном происходит в эпителиальных клетках дыхательных путей человека и других млекопитающих, и в эпителиальных клетках кишечного тракта птиц. Клеточный цикл вируса начинается со связывания с клеткой-мишенью (Рисунок 3). Это связывание опосредуется вирусным НА, который связывается с сиаловыми кислотами, присутствующими в олигосахаридах

гликопротеинов на клеточной поверхности, а также отвечает за гемагглютинацию, вызываемую вирусными частицами при инкубации с эритроцитами. НА из вирусов гриппа человека предпочтительно связываются с сиаловыми кислотами, связанными $\alpha 2,6$ -связью с остальной частью олигосахарида, тогда как НА из большинства вирусов птичьего гриппа предпочитают связываться с $\alpha 2,3$ -связанными сиаловыми кислотами [9]. После связывания вирус интернализуется в эндосоме, а эндосома перемещается и подкисляется, что вызывает конформационное изменение в вирусном НА, которое вызывает слияние оболочки вируса с оболочкой эндосомы. Поскольку рН эндосом варьируется у разных видов хозяев, стабильность рН НА является одной из детерминант вирусного тропизма. В результате слияния содержимое вируса, а именно его генетический материал в виде восьми вирусных рибонуклеопротеидов (вРНП), высвобождается в цитоплазму. вРНП впоследствии импортируются в ядро инфицированных клеток, где происходит транскрипция и репликация вирусной РНК посредством ферментативной активности вирусного полимеразного комплекса, присоединенного к вРНП. Репликация вирусной РНК происходит через промежуточное соединение с положительным смыслом, известное как комплементарный рибонуклеопротеиновый (кРНП) комплекс. Транскрипция вирусной РНК приводит к образованию мРНК с положительной цепью, которые блокируются и полиаденилируются и экспортируются в цитоплазму для трансляции в вирусные белки. Вновь синтезированные вирусные полимеразы (PB1, PB2 и PA) и вирусные NP импортируются в ядро для дальнейшего увеличения скорости синтеза вирусной РНК, тогда как белки вирусной мембраны NA, NA и M2 направляются к плазматической мембране и встраиваются в нее. Вновь синтезированная НА должна быть расщеплена на полипептиды NA1 и NA2 клеточными протеазами, чтобы быть функциональной. Сайт расщепления НА отвечает за тропизм вируса к тканям, при этом все вирусы гриппа имеют сайт расщепления, распознаваемый внеклеточными протеазами, присутствующими в эпителиальных клетках дыхательных путей и кишечника, за исключением вирусов HPAI, которые содержат многоосновной сайт расщепления в НА, который распознается вездесущими протеазами. Вирусные неструктурные белки NS1, PB1-F2 (которые могут быть димерными или мультимерными) и PA-x регулируют клеточные процессы, обезвреживая противовирусные реакции хозяина. Вирусные M1 и NEP локализуются в ядре на поздних стадиях вирусной инфекции, связываются с вРНП и опосредуют их экспорт в цитоплазму, где посредством взаимодействия с рециклирующей эндосомой они мигрируют к плазматической мембране и объединяются в восемь вРНП. Происходит почкование новых вирионов, что приводит к включению вРНП в новые вирусные частицы с мембраной, полученной из плазматической мембраны хозяина и содержащей вирусные трансмембранные белки. Активность NA предотвращает

непродуктивное связывание НА новых вирионов с рецепторами, несущими сиаловую кислоту, присутствующими в вирусных гликопротеинах и в мембране инфицированных клеток, способствуя распространению вируса. Репликация вируса приводит к гибели клеток с патологическими последствиями. Кроме того, вирусные продукты вызывают провоспалительную реакцию, которая отвечает за привлечение врожденных и адаптивных иммунных клеток, которые элиминируют и элиминированы вирусом, но в избытке вызывает иммунопатологию и пневмонию.

1.2 Антигенная характеристика

1.2.1 Структура гемагглютинина (НА)

Как было сказано ранее, жизненный цикл вируса начинается с прикрепления к восприимчивому хозяину. Это обеспечивают гликопротеины гемагглютинина (НА), находящиеся на поверхности вируса гриппа А, они связываются с сиаловыми кислотами (SA) на поверхности клетки-хозяина. Специфичность НА в отношении SA различается у разных видов животных и способствует ограничению круга хозяев [10].

Взаимодействие НА-гликанового рецептора имеет решающее значение для инфекции человека. В частности, для этого требуется остаток α -2,6 SA на человеке-хозяине. Следовательно, IAV человека будет предпочтительно связываться с остатком α -2,6 SA, в то время как IAV птиц обладает специфичностью к остатку α -2,3 SA, тем самым ограничивая эффективную передачу IAV между птицами и людьми.

Гликановые рецепторы, оканчивающиеся связью α 2 \rightarrow 6 сиаловой кислоты преимущественно содержатся в верхних дыхательных путях, таких как трахея, в то время как альвеолярные клетки нижних дыхательных путей покрыты α -2,3-SA [13]. Ранее было продемонстрировано, что тропизм к гликановым рецепторам, оканчивающимся связью α 2 \rightarrow 6 сиаловой кислоты у подтипов H1, H2, H3 является одним из ключевых факторов, коррелирующих с их способностью эффективно передаваться воздушно-капельным путем у хорьков — хорошо зарекомендовавшая себя модель на животных для измерения потенциала переносимых по воздуху передача от человека к человеку [76].

Ключевую роль в определении предпочтения связывания с рецептором птицы или человека играют 130- (остатки 131-138), 140- (остатки 140-145) и 220- (остатки 219-228) петли и часть 150-петли (остатки 150-160) в сайте связывания гемагглютинина, эти петли вступают в контакт с дисахаридным мотивом в базовой области.

После появления в 2013 г. низкопатогенных вирусов птичьего гриппа А(Н7N9) начали накапливаться свидетельства того, что новый вирус гриппа А происходит из птичьего резервуара, но без признаков устойчивой передачи от человека к человеку. Переключение специфичности вирусного НА с птичьих α -2,3 SA на человеческие α -2,6 SA рецепторы обеспечивает повышенную аффинность связывания в верхних дыхательных путях человека [73].

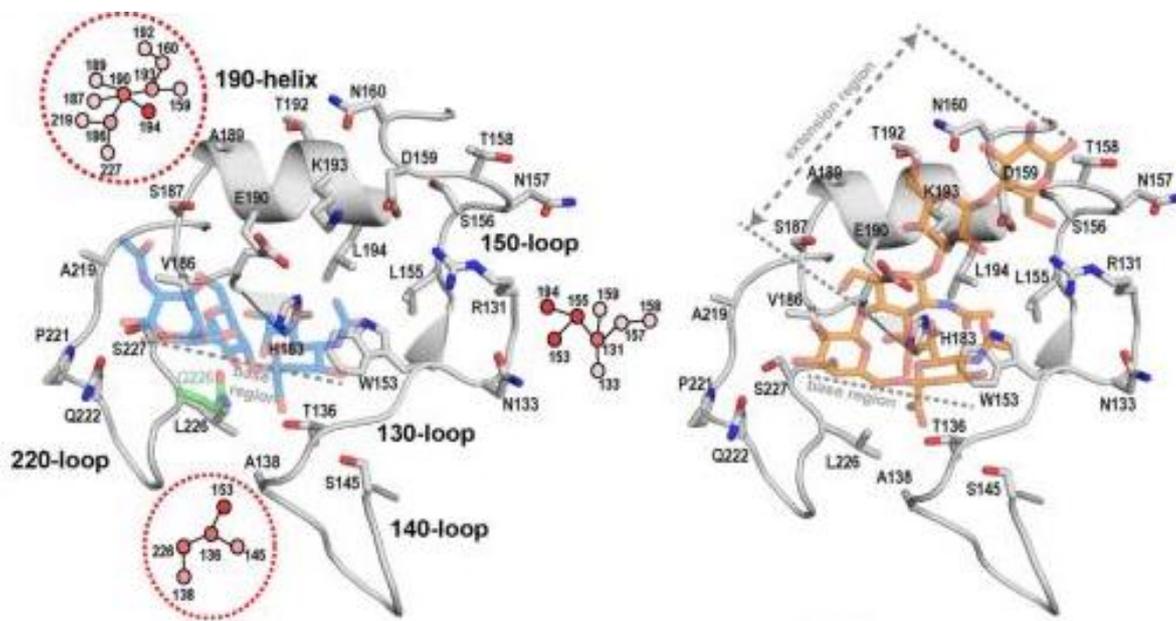


Рисунок 3. Структурная модель НА в комплексе с птичьим (слева) и человеческим (справа) рецептором [14].

Изменение сродства молекулы гемагглютинаина вируса Н7N9 к рецепторам силовой кислоты человека связана с заменой глутамина (Q) на лейцин (L) в положении 226 НА (НА-Q226) [91]. Изначально предполагалось, что данная замена будет увеличивать силу аффинности связывания НА с человеческими α -2,6-связанными рецепторами SA.

Однако, оказалось, что для НА Н7N9 характерно скорее ограниченное связывание с α -2,6-связанными рецепторами SA в верхних дыхательных путях по сравнению со связыванием с человеческими рецепторами других адаптированных для человека НА [15].

Несмотря на это, экспериментальные данные показывают, что НА-Q226L остается критически важным для связывания с α -2,6 SA и обеспечивает передачу вирусов Н7N9 в хозяевах-млекопитающих [16]. Было продемонстрировано, что вирусы А/Anhui-WT с НА-226L одинаково хорошо связывается как с α -2,3, так и с α -2,6 рецепторам на поверхности эпителиальных клеток свиней и обеспечивают эффективную прямую контактную передачу среди них. Если вирусы Н7N9 с мутацией НА-226L попадут в популяцию свиней, это может представлять собой значительное селективное преимущество и привести к появлению новых

реассортантов, так как свиньи являются «смесительными сосудами» и обеспечивают смешивание вирусов человеческого, свиного и птичьего гриппа [17].

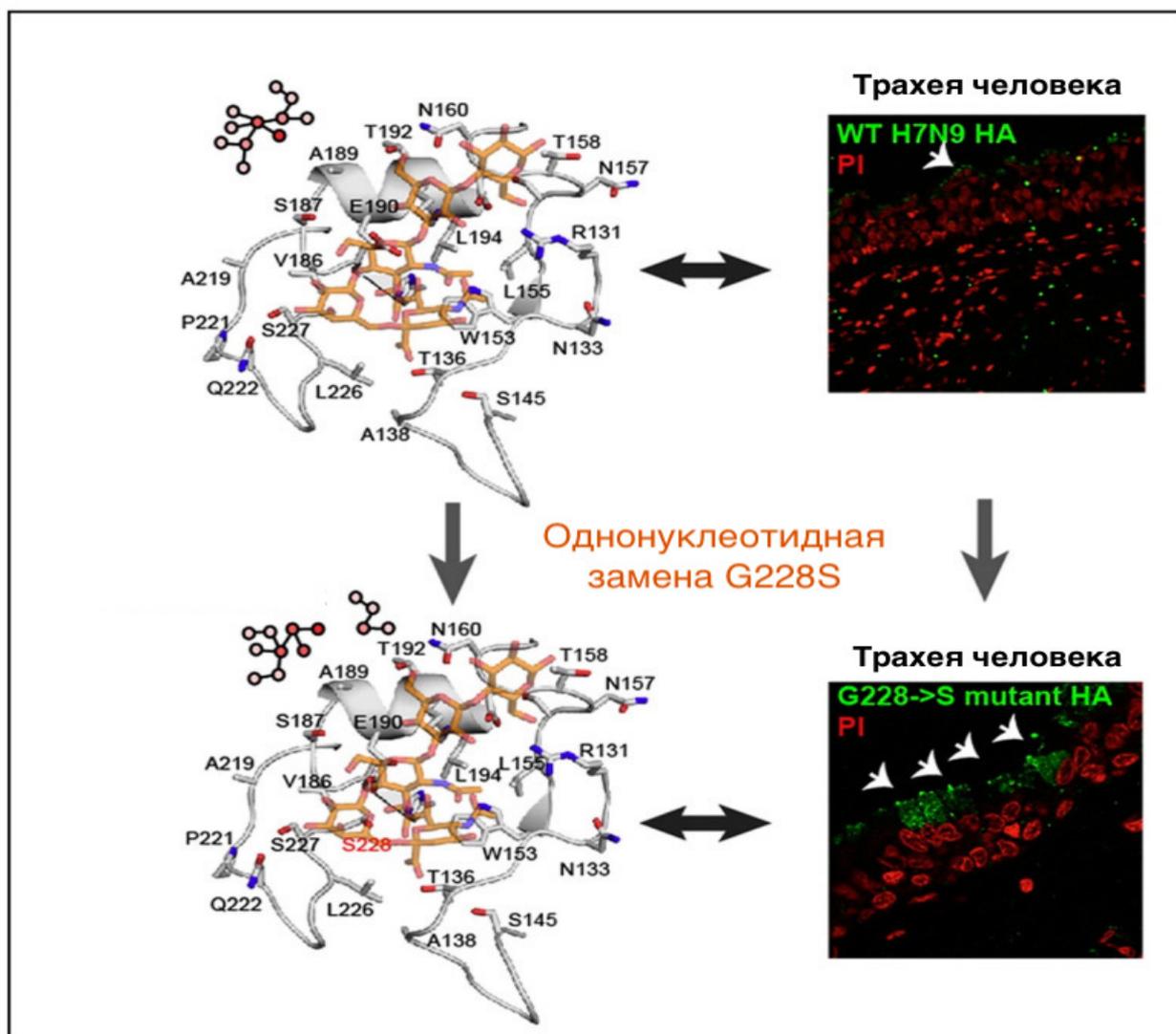


Рисунок 4. Структурная модель RBS HA H7N9 в комплексе с человеческим рецептором (WT) и структурная модель мутанта G228S Anh13 H7 HA в комплексе с человеческим рецептором. Окрашивание клеток трахеи человека гемагглютинином G228S (A/Anhui/1/2013) и вирусом дикого типа (WT)

Экспериментальное сравнение сайта связывания гликанового рецептора для A/Anhui/1/2013 с H3 HA выявило критическую важность S228 для H3. Аминокислотная замена Gly228→Ser модифицирует аминокислотную сеть H3, которая содержит остатки S186, T187 и E190 в сайте связывания гликанового рецептора (RBS), в результате чего эта сеть структурно позиционирует E190 таким образом, что он может вступать в критический контакт с сиаловыми кислотами рецепторов как птиц, так и человека. Структурный анализ и анализ последовательности показал, что вирус H7N9 A/Anhui/1/2013 не содержит такой аминокислотной сети и в 228 положении находится глицин. G228 изменяет положение

контактных остатков, включающих E190, и в результате снижается связывание с клетками респираторного эпителия человека. Введение же мутации G228S в H7 HA приводило к экстенсивному связыванию с тканью трахеи человека (Рисунок 4) [16].

Таким образом, мутация HA-Q226L хоть и указывает на процесс адаптации млекопитающих к H7N9 и свидетельствует о предпочтительном связывании с α -2,6 SAs у людей, но не обязательно придает высокую avidность связывания. Устойчивая передача у людей требует дополнительных аминокислотных замен со специфичностью к α -2,6-связанным остаткам SA [18]. Тем не менее, замена HA-Q226L имеет решающее значение для специфичности связывания рецептора α -2,6 и способствует зоонозной передаче.

1.2.2 Структура нейраминидазы (NA)

Как было описано ранее, на тропизм вируса гриппа к хозяину сильно влияет специфичность вирусных рецепторов и avidность к гемагглютанину (HA), который преимущественно связывается с рецепторами α -2,6 SA, что приводит к слиянию вирусной оболочки с клетками-хозяевами, в то время как нейраминидаза (NA) ответственна за отщепление силовой кислоты от гликопротеиновых и гликолипидных сиалконъюгатов, что способствует высвобождению вируса с клеточной поверхности и его распространению, а также препятствует его опосредованную рецептором самоагрегацию [19].

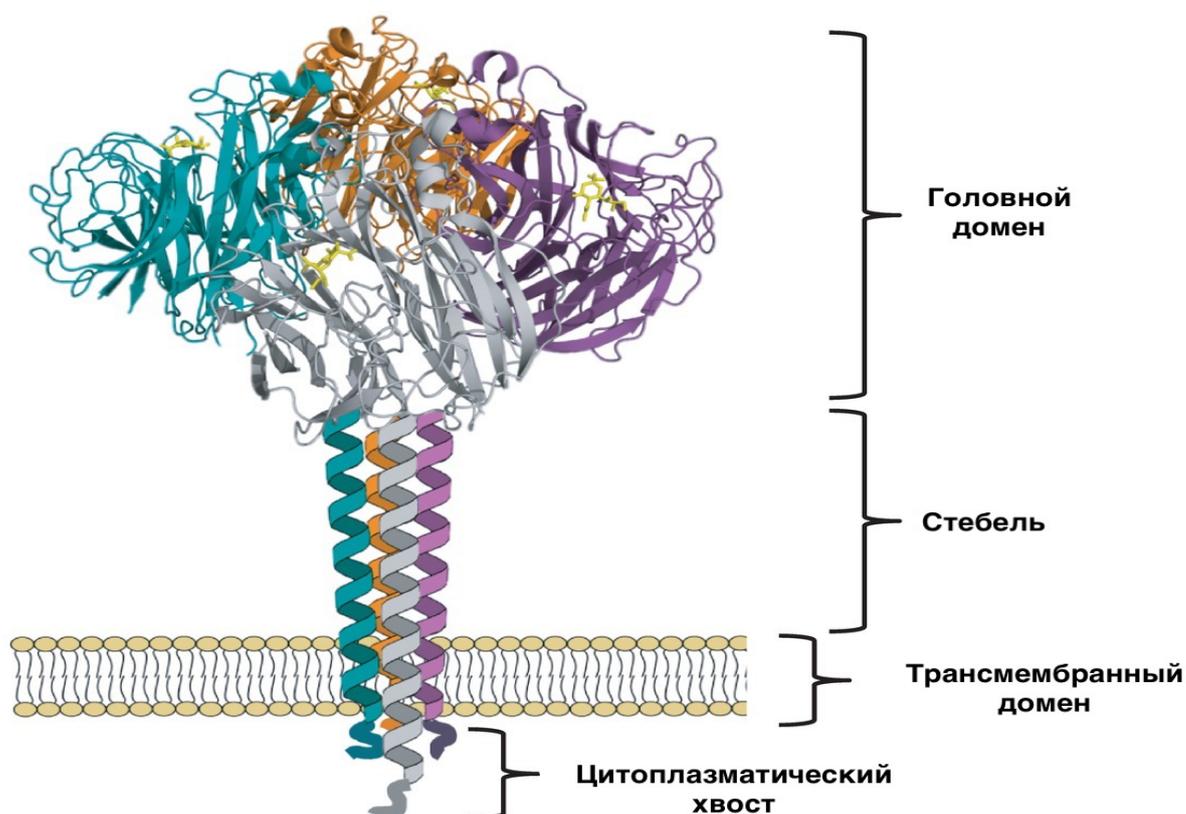


Рисунок 5. Строение нейраминидазы.

Баланс между активностью HA и NA считается критическим для репликации и эффективной передачи вируса гриппа А. Изменения свойств связывания рецепторов белка HA часто сопровождаются изменениями ферментативных свойств NA [20]. Следовательно, мутации в NA также могут приводить к изменениям фактов вирулентности.

Нейраминидаза NA представляет собой экзосиалидазу (EC 3.2.1.18), образующую гомотетрамер [23]. Каждый мономер NA включает в себя около 470 аминокислот и состоит из четырех доменов: короткого N-концевого цитоплазматического хвоста, гидрофобного трансмембранного, глобулярного «головного» домена, а также «ножки» различной длины, соединяющего головку с трансмембранным доменом.

Строение головного домена

Каталитическая головка NA состоит из четырех мономеров, каждый из которых имеет форму шестилопастного пропеллера, при этом каждая лопасть имеет четыре антипараллельных β -слоя, стабилизированных дисульфидными связями и соединенных петлями переменной длины [21]. Общая структура мономера нейраминидазы N9 представлена на рисунке 6.

В головном домене NA содержится активный сайт и кальций-связывающий домен, стабилизирующий структуру фермента. Активный сайт состоит из высококонсервативных каталитических и структурных остатков, которые либо непосредственно контактируют с SA, либо стабилизируют каталитические остатки (Рисунок 6).

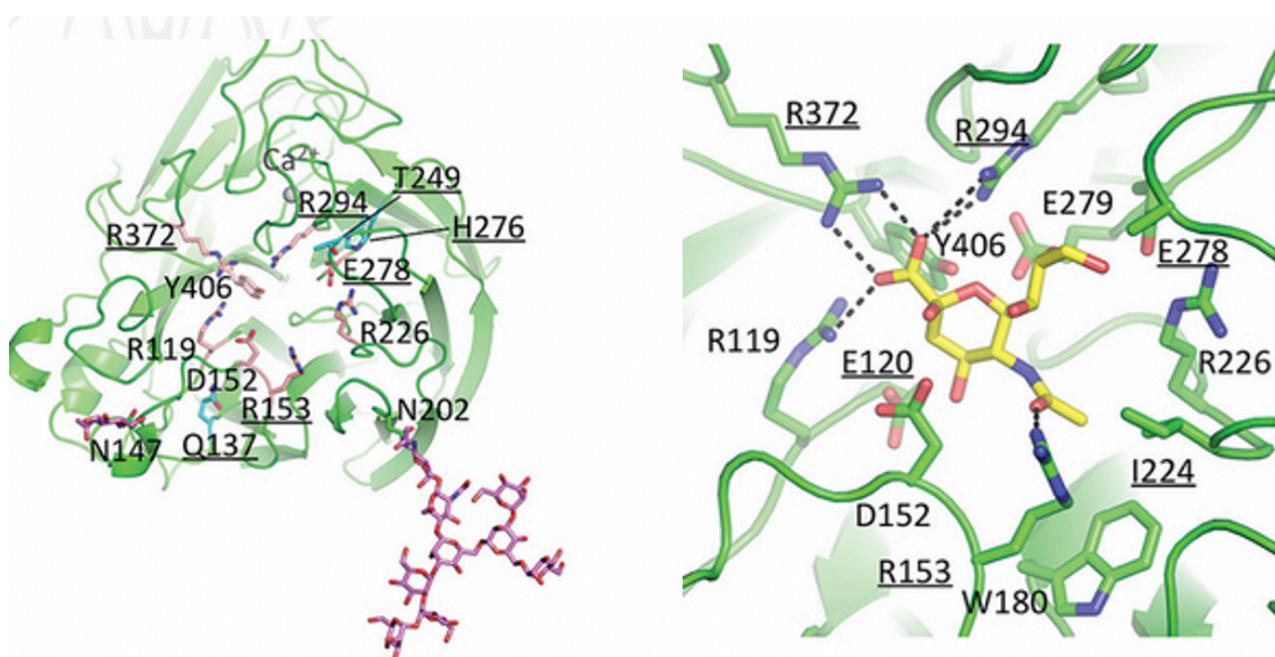


Рисунок 6. Общая структура мономера нейраминидазы N9 и структура активного сайта связывания с SA [17]

Поскольку аминокислотные последовательности разных нейраминидаз отличаются друг от друга вставками и делециями, принято выделять подтип NA, в соответствии с которым производится нумерация аминокислот, поэтому в последующем при характеристике доменов нейраминидаз будет использоваться либо нумерация подтипа N2, либо N9.

Активный сайт среди всех подтипов высококонсервативных остатков Arg119, Asp152, Arg153, Arg226, Glu278, Arg294, Arg372 и Tyr406 в N9(остатки Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 и Tyr406 в N2) (Рисунок 6). Все это заряженные/остатки, которые непосредственно взаимодействуют с субстратом в каталитическом центре. Пространственная структура активного центра стабилизирована за счет сети водородных связей и солевых мостиков за счет набора в значительной степени консервативных остатков каркаса, Glu120, Arg157, Trp180, Ser181, Asn200, Ile224, Glu229, His276, Glu279, Asn296 и Glu425 (остатки Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Glu227, His274, Glu277, Asn294 и Ile427. в N2) [25].

Кальций связывающий домен образован атомами кислорода остатков основной цепи из N295, G299, D326 и N348 N9 (остатки 293, 297, 324 и 347 в N2). Кальций связывается за счет взаимодействия с этими четырьмя атомами кислорода и двумя молекулами воды.

Кальций имеет решающее значение для термостабильности и активности NA вируса гриппа [24].

Сайт гликозилирования образован остатками аспарагина, в частности Asn146. N146 расположен на дистальной поверхности мембраны в непосредственной близости от активного центра и является единственным консервативным сайтом гликозилирования среди всех других NA вирусов гриппа А и В.

Углеводная цепь отличается от всех других углеводов, встречающихся во всех гликопротеинах вируса гриппа: она несет О-4 сульфатированный N-ацетилгалактозамин [21]. Гликозилирование Asn146 выполняет регуляторную функцию и влияет на ферментативную активность NA, определяя тем самым нейровирулентность вируса [27, с. 33].

Количество сайтов гликозилирования может варьировать, так N9 NA имеет 3 потенциальных сайта гликозилирования, в N86, N147 и N202 (остатки 85, 146 и 200 в N2)[28].

Как было описано ранее, для гриппа А описано одиннадцать подтипов NA. Эти подтипы гриппа А NA делятся на две отдельные группы: группа 1 содержит N1, N4, N5 и N8, а группа 2 содержит N2, N3, N6, N7 и N9 [29]. Различие состоит в том, что в структуре группы 1 (1N) NA есть дополнительная полость рядом с активным центром. Полость создается движением «петли 150» (остатки 147–152). Подобная полость не была обнаружена в структурах N9, относящегося ко второй группе (Рисунок 7) [30].

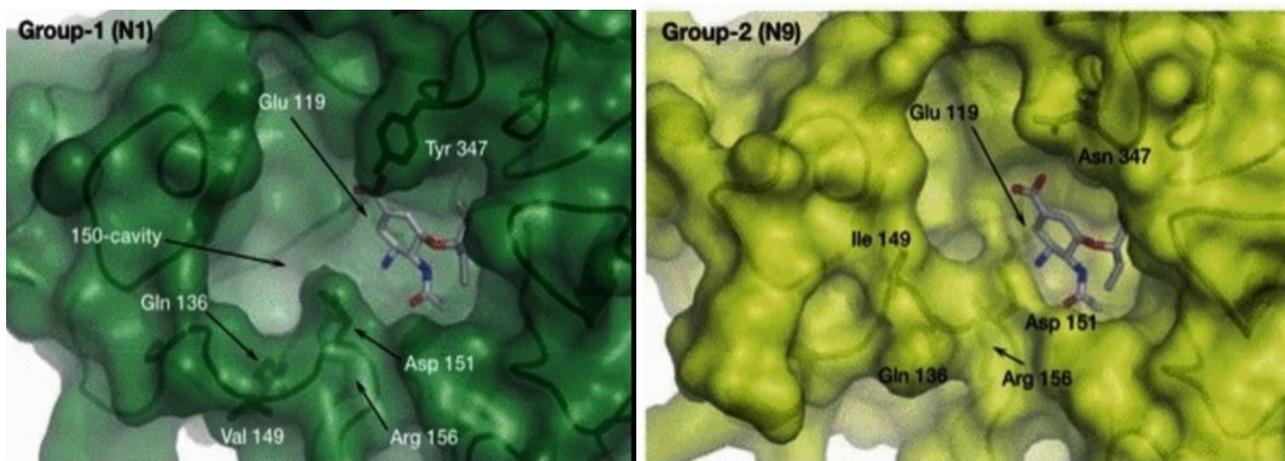


Рисунок 7. Структура нейроменидазы группы 1 (N1) с дополнительной полостью и структура NA группы 2 (N9)

Экспериментально было выявлено, что нейраминидазы нескольких птичьих IAV, в том числе N9, проявляют гемадсорбционную активность, которая не блокируется ингибиторами каталитического сайта, и содержат второй сайт связывания силовой кислоты (SA), который был назван HBsite (Рисунок 8) [79].

Этот сайт представляет собой неглубокий карман расположенный рядом с каталитическим сайтом и состоящий из трех поверхностных пептидных петель: петля 367-372, участвующая в связывании силовой кислоты через сериновые остатки 367, 370 и 372; петля 400 – 403, взаимодействующая с субстратом через боковую цепь аспарагина 400, карбонильный кислород основной цепи аспарагина и триптофан 403; петля 430 – 433 взаимодействующая с нейраминовой кислотой через ϵ -аминогруппу лизина 432 (нумерация N2) [30]. Пять из шести контактных остатков SA во 2-м сайте связывания SA N9 являются высококонсервативными во всех генотипах NA птиц.

Долгое время биологическое значение 2-го сайта связывания SA в птичьих NA оставалось неясным, и практически ничего не было известно о его специфичности связывания SA [31]. Было известно лишь, что способность NA связывать эритроциты соответствует эффективности расщепления других поливалентных субстратов.

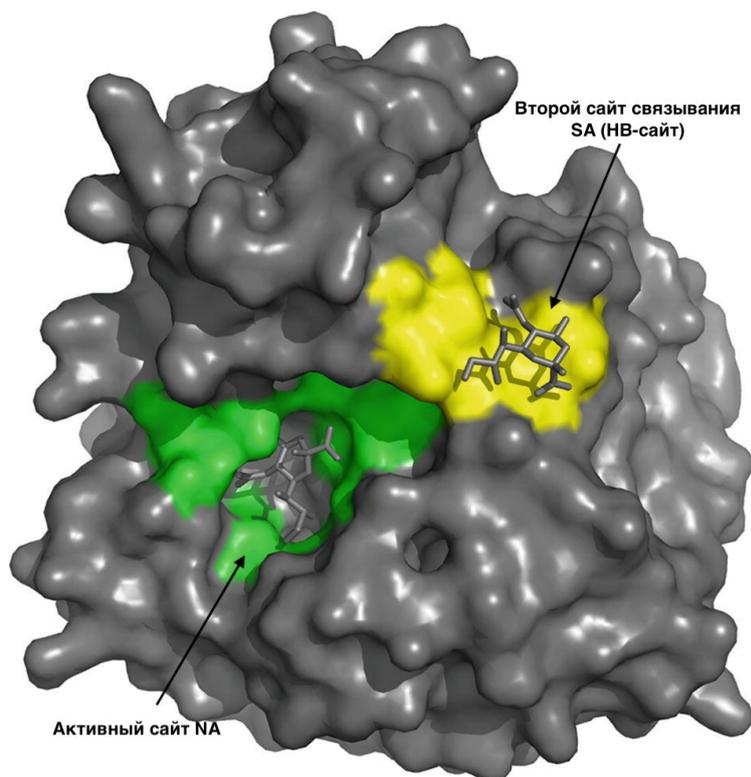


Рисунок 8. Расположение активного сайта и НВ-сайта в молекуле нейраминидазы

Однако позднее, при исследовании второго сайта связывания SA нейраминидазы H7N9, было показано, что связывание субстрата через этот сайт увеличивает каталитическую эффективность NA по отношению к тому же субстрату за счет рекрутирования и удерживания поливалентных сиалозидов вблизи активного сайта, обходя необходимость мутации высококонсервативных ключевых остатков в каталитическом сайте NA.

Также при изучении последовательностей N9, появившихся в 2013 году вирусов гриппа А H7N9, была выявлена уникальная для этих вирусов мутация T401A во втором сайте связывания SA. T401 (нумерация N2) является частью петли (остатки с 399 по 403, показаны зеленым цветом,), которая образует H-связь через Asn400 с SA, и обеспечивает решающее стэкинг-взаимодействие между SA и ароматической боковой цепью Trp403 (Рисунок 9). Thr401 не находится в прямом контакте с силовой кислотой, однако, было показано, что замена T401A в N9 приводит к потере опосредованной водой водородной связи с Asp402

(Рисунок 9). Потеря этого взаимодействия может повлиять на локальную укладку 2-го сайта связывания SA и, таким образом, уменьшить связывание с SA [32].

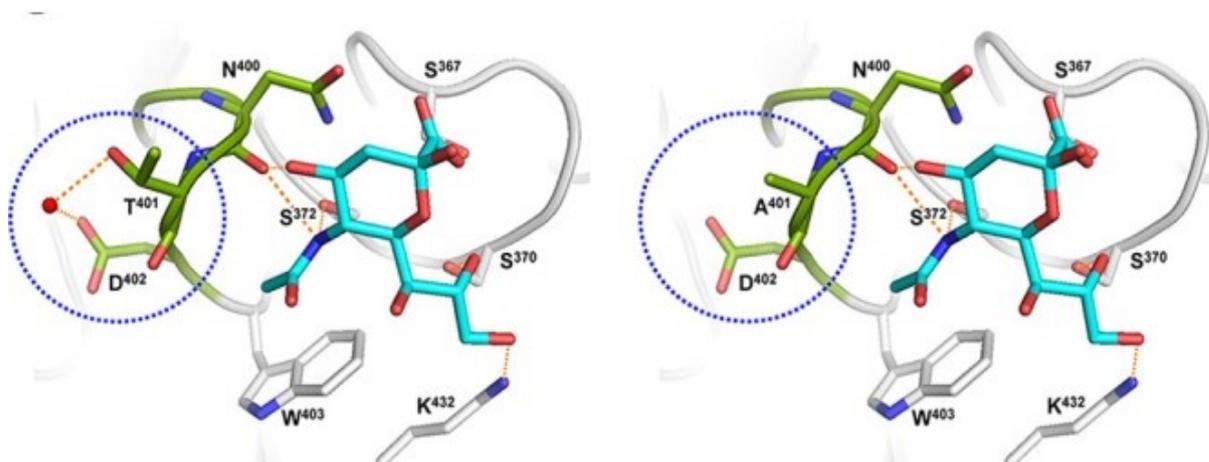


Рисунок 9. Кристаллическая структура вторичного сайта связывания рецептора NA с заменой в T401A в комплексе с сиаловой кислотой.

Филогенетический анализ показал, что эта замена предшествовала характерной для H7N9 небольшой 5-аминокислотной делеции в стебле [33], а также замене NA-Q226L, связанной с изменением сродства гемагглютинаина вируса H7N9 к рецепторам. Предполагается, что эти первоначальные функциональные изменения во втором сайте связывания белка N9 позволили впоследствии приобрести измененные рецепторсвязывающие свойства белка H7 и также способствовали тем самым распространению и повышению способности вируса инфицировать человека по сравнению с другими птичьими вирусами.

Строение стеблевого домена

Стеблевые домены NA разных подтипов вируса гриппа хоть имеют некоторые общие структурные особенности, такие как наличие хотя бы одного остатка цистеина, при этом количество и последовательности аминокислот сильно различаются. Длина стебельчатой области различных подтипов может оказывать существенное влияние на вирулентность, устойчивость к лекарствам и тропизм вируса к человеку.

Примечательной характеристикой нейраминидазы вируса H7N9 является делеция аминокислот с 69 по 73 в стебле NA.

Ранее уменьшение длины стебля NA были выявлены среди других подтипов птичьего гриппа, таких как H5N1, H6N1, H7N1, H7N3 и H9N2 [11], [34], [35], [36]. Хотя укороченный стебель NA считается остатком молекулярной эволюции, следует отметить, что после ранней адаптации IAV от диких водоплавающих птиц к наземным птицам такая делеция впервые наблюдалась у N9

Известно, что некоторые делеции NA вызывают усиление вирулентности, например у H5N1[37]. Поэтому аналогичные делеции аминокислот (остатки NA 49–68, 54–72 и 54–73) тестировали на мышах путем делеции эти последовательности в трех отдельных мутациях (A/Anhui/1/2013). Было обнаружено, что вирулентность у мышей была повышена для вирусов с укороченной ножкой NA по сравнению с их аналогами с длинной ножкой. Вирусы с коротким стеблем NA показали пониженную способность к элюированию из эритроцитов и повышенную вирулентность у мышей [38], хотя при этом естественная делеция 5 аминокислот в стебле NA H7N9 не оказала существенного влияния на активность NA, репликацию вируса или патогенез у мышей [39], [20]. Повышение патогенности при более длинных делениях в стебле нейраминидазы было связано с нарушением баланса между HA и NA, которые играют решающую роль в проникновении и высвобождении вируса.

Естественная делеция пяти аминокислот по-видимому не оказала существенного влияния на баланс HA-NA [38].

Также было продемонстрировано, что укороченный стебель NA является сильной детерминантой вирулентности и адаптации вирусов гриппа водоплавающих птиц у кур [40].

Предположительный механизм адаптации заключается в том, что делеция в стебле нейраминидазы приводит к более компактной структуре нейраминидазы. В то время как удлинение стебля NA понижает вирулентность, делая нейраминидазу более доступной к субстратам (α -2,3 SA, α -2,6 SA) вокруг него, что впоследствии приводит к расщеплению большего количества субстратов и меньшему количеству новых инфекций, тем самым понижая вирулентность [41]. Уменьшение длины стебля NA приводит к тому, что нейраминидаза связывается с меньшим количеством субстрата, так как соседняя молекула HA может стерически препятствовать ее приближению, и тем самым способствует увеличению вирулентности и патогенности вируса. В виду того факта, что вирус гриппа A H7N9 имел гораздо более высокий уровень летальности по сравнению с пандемическим гриппом H1N1 [42], делеция в его стебле нейраминидазы могла иметь аналогичный эффект.

Таким образом, судя по всему, 5-аминоксилонная делеция стебля нейраминидазы у H7N9 существенно влияет на приспособленность или патогенез вируса. Вероятно, что в комплексе мутация во втором сайте связывания SA NA в совокупности с укорочением стебля

нейраминидазы вызвали изменения в НА для восстановления баланса НА-НА, что и способствовало повышению вирулентности H7N9.

Лекарственная устойчивость

Существует несколько классов химиопрепаратов, активных в отношении вирусов гриппа. Первыми были открыты препараты адамантанного ряда, к которым относятся амантадин и ремантадин. Они представляют собой небольшие амфифильные молекулы с гидрофобным адамантанным ядром и протонированной аминогруппой. Эти препараты действуют на стадиях проникновения и раздевания вируса. Гидрофобное адамантное ядро необратимо блокирует просторный канал, образованный белком М2. Это приводит к тому, что вирусный геном не высвобождается в цитоплазму, и при слиянии поздних эндосом с лизосомами вирионы разрушаются лизосомными ферментами. В результате чего выход вирусного потомства резко снижается [43]. Проблема с препаратами адамантанного ряда заключается в том, что к ним быстро вырабатывается резистентность. Так было обнаружено, что снижение чувствительности вируса гриппа А к ремантадину происходит при замене в первичной последовательности белка М2 остатка Ser-31 на Asn (S31N) H5N1 [44]. Замена S31N в белке М2 была выявлена и при анализе последовательности генома А(H7N9), что свидетельствует о перекрестную устойчивость H7N9 к адамантанам [10].

Более распространенным является второй класс антигриппозных препаратов, который представлен ингибиторами НА, в частности занамивиром, осельтамивиром и перамивиром.

Они являются структурными аналогами сиаловых кислот и необратимо связываются с консервативными аминокислотными остатками, образующими активный центр НА.

Эти препараты действуют на поздней стадии цикла репродукции вируса и блокируют отсоединение вирионов от цитоплазматической мембраны. В отличие от ремантадина, резистентность к ингибиторам НА приобретает гораздо медленнее и редко среди циркулирующих в настоящее время вирусов сезонного гриппа и зоонозного гриппа.

Однако по данным ВОЗ в 2008-2009 годах около 99% циркулирующих штаммов вируса гриппа А(H1N1) было устойчиво к осельтамивиру. Такое быстрое и глобальное распространение резистентных к ингибитору НА вирусов сезонного гриппа выявило тревожную способность лекарственно-устойчивых вирусов гриппа становиться трансмиссивными и приобретать это избирательное преимущество [45].

Было продемонстрировано, что появлению резистентных вирусов предшествует длительное лечение пациентов осельтамивиром и занамивиром, а также иммунодефицитные

состояния [46]. Резистентные вирусы обычно приобретают аминокислотную замену в NA, которая ослабляет связывание лекарственного средства.

Для выявления потенциально устойчивых вирусов в лаборатории эпиднадзора используют биохимический анализ ингибирования нейраминидазы (NI). В этом анализе определяют концентрацию лекарственного средства, необходимую для ингибирования активности NA на 50% (IC 50), и сравнивают с эталонным значением IC 50. Увеличение кратности <10, 10–100 и >100 интерпретируется как нормальное, сниженное ингибирование (RI) или сильно сниженное ингибирование (HRI) под действием конкретного противовирусного препарата [80]. Обнаружение HRI часто рассматривается как признак потенциальной клинически значимой резистентности.

Было показано, что вирусы A(H7N9), собранные у пациентов после лечения осельтамивиром, развивают изменения в NA, которые, по-видимому, придают устойчивость к осельтамивиру и другим ингибиторам NA. Так, замена в NA Arg292Lys (R292K в нумерации аминокислот N2; R294K в нумерации N9) была выявлена в вирусах A(H7N9), полученных от пациента вскоре после начала лечения осельтамивиром. Данная замена связана с резистентностью *in vitro* к ингибиторам нейраминидазы в подтипе N9 [47]. Кроме того, была обнаружена замена 119Glu/Val (E119V нумерация N2, E120V N9), появление которой также было связано с лечением осельтамивиром пациентов, инфицированных вирусами A(H7N9)[48]. В 2013 году у пациента из Тайваня, получавшего лечение осельтамивиром, пиротетранином выявлено четыре замены в NA. Помимо NA-R292K, NA-E119V в NA было обнаружено две дополнительные мутации в консервативных остатках NA-I222K или NA-I222R [49].

Оба изменения NA, R292K (R294K N9) и E119V (E120V N9), ранее ассоциировались с устойчивостью к осельтамивиру у пациентов, инфицированных сезонным гриппом A(H3N2) [50]. В то время как замены NA, придающие устойчивость к осельтамивиру, в вирусах сезонного гриппа H3N2 были обнаружены преимущественно у детей или пациентов с

ослабленным иммунитетом [51], варианты NA гриппа A(H7N9) были обнаружены у здоровых взрослых [52].

R294 (N9) входит в состав активного центра NA, участвует в катализе и на прямую взаимодействует с рецепторами, содержащими силовую кислоту. Этот аминокислотный остаток вместе с R119 и R372 (остатки 118 и 371 в N2) образуют водородные связи с карбоксильной группой ингибиторов, карбонильный кислород N-ацетильной группы связывается с R153 (остаток 152 в N2).

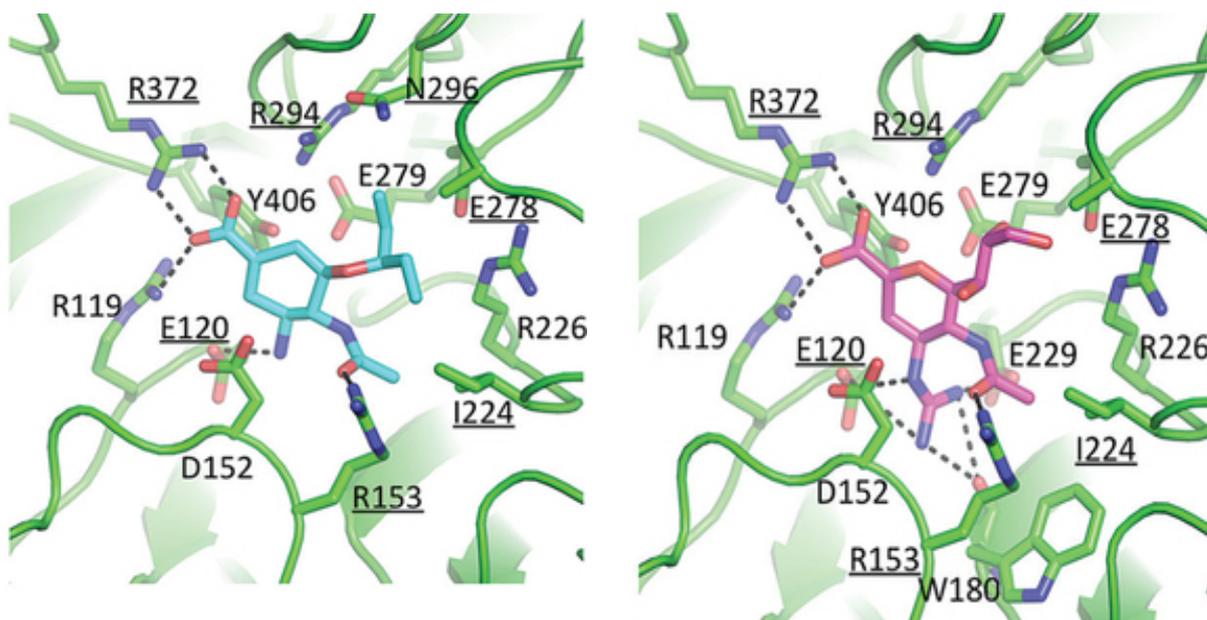


Рисунок 10. Активный сайт связывания нейроменидазы с осельтамивиром (справа) и занамивиром (слева) [26]

В отсутствие замены R294K в NA, E278, который представляет собой гибкий остаток, образует солевой мостик с R226, конформацию благоприятную для связывания гидрофобной пентилоксигруппы карбоксилата осельтамивира. При замене аргинина на лизин в 294 положении в N9 между K294 и E278 образуется солевой мостик, в результате чего E278 принимает конформацию, препятствующую связыванию пентилоксигруппу осельтамивира.

H7N9 с заменой R294K также проявляет умеренную устойчивость к занамивиру, ланинамивиру и перамивиру. В целом, взаимодействия между N9 NA и различными ингибиторами аналогичны, хотя между NA и занамивиром образуется больше водородных связей (Рисунок 10). Существует два дополнительных взаимодействия водородных связей между 8-гидроксильной группой занамивира и R294 (остаток 292 в N2) и 9-осельтамивиром с R226 (остаток 224 в N2) в структуре комплекса NA-занамивир.

В свою очередь, E120 (E119 N2) и I224 (I222 N2) являются каркасными остатками, поддерживающими геометрию каталитического центра NA [54]. I224 и E120 связываются с

ингибиторами через гидрофобные взаимодействия. Было продемонстрировано, что замены E119V, NA-I222K и I222R в NA вызывали снижение ингибирования осельтамивиром. Мутация I222K также увеличивала вирулентность H7N9 в отношении мышей.

Экспериментально было продемонстрировано, что NA-R292K вызывает большую функциональную потерю ферментативной активности NA [25], чем замены по каркасным аминокислотным остаткам, потенциально приводя к большому дефициту приспособленности вируса к репликации [54]. Также NA-R292K приводит к более значительному снижению ингибирования осельтамивиром и перамивиром, чем NA-E119V, NA-I222K и NA-I222R. Поэтому необходимо тщательно отслеживать эти мутации лекарственной устойчивости, в частности NA-R292K, для введения наиболее эффективных лекарств.

Таким образом, понимание механизмов, посредством которых вирусы становятся устойчивыми к ингибиторам NA, необходимо для эффективного вирусологического надзора и для принятия обоснованных решений в отношении клинической помощи.

1.3 Эволюция и антигенный дрейф H7N9

Вирусы H7N9 неоднократно проникали в человека с 2013 года. Адаптации организма к изменяющимся условиям окружающей среды способствует его генетическая изменчивость, которая устанавливается с помощью механизмов, варьирующихся от однонуклеотидных полиморфизмов до крупномасштабных структурных вариаций.

До 2013 года вирусы птичьего гриппа подтипа H7 в основном обнаруживались у птиц и лишь иногда вызывали легкие инфекции у человека. В марте 2013 года у людей с пневмонией был выделен новый вирус H7N9, который был идентифицирован как низкопатогенный вирус птичьего гриппа (LPIAV). Он стал причиной 1534 случаев заражения людей, которые по состоянию на 30 ноября 2017 г. привели к 608 смертельным исходам [56].

Периодические волны случаев заболевания людей были зарегистрированы в 27 провинциях Китая, что указывает на устойчивую передачу вирусов H7N9 [58]. Более того, с момента своего появления вирус H7N9 рекомбинировал с вирусами гриппа A(H9N2), циркулирующими в Китае, что привело к появлению все более разнообразного массива вирусных геномов [59].

С момента появления вируса H7N9 в марте 2013 г. произошло пять волн инфекции.

Примечательно, что пятая волна началась раньше, чем предыдущие четыре, с внезапным и резким увеличением числа случаев заболевания людей, что сделало ее крупнейшей вспышкой гриппа A(H7N9) с 2013 г. Более того, пятая волна продемонстрировала значительное расширение географического ареала, что вызвало беспокойство

общественного здравоохранения. Так как расширение ареала увеличивает риск совпадения пиков эпидемии H7N9 во времени и пространстве с пиками сезонного гриппа, что в свою очередь может привести к более высокому риску реассортации. Пятая волна также характеризуется появлением высокопатогенных вирусов гриппа H7N9, которые представляют повышенную угрозу как для домашней птицы, так и для человека. В связи с этим был предпринят ряд действий для контроля и искоренения вирусов H7N9 в Китае. Помимо убоя домашней птицы, инфицированной смертельными вирусами H7N9, было проведено вакцинирование, использовалась бивалентная инактивированная вакцина H5/H7.

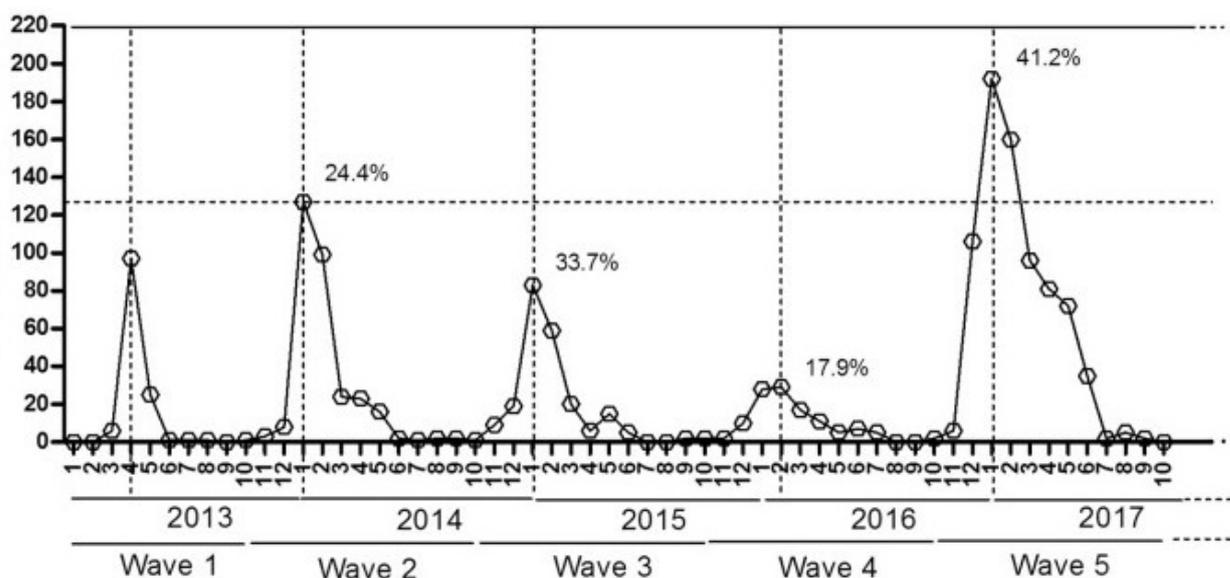


Рисунок 11. Временное распределение случаев инфицирования людей A/H7N9 [67]

Вакцинация привела к снижению распространенности вирусов H7N9 среди домашней птицы, и значительному уменьшению случаев заболевания среди людей, предотвратив тем самым «шестую волну» заражения людей вирусом H7N9 (рисунок 10).

Линии вируса H7N9 происходят из 2 густонаселенных районов: района дельты реки Янцзы в восточном Китае и района дельты Жемчужной реки в центральной провинции Гуандун [81], [87].

Хотя точное происхождение вирусов H7N9 неизвестно, внутренние гены потенциально происходят от птичьих вирусов H9N2 (A/brambling/Beijing/16/2012), тогда как гены, кодирующие вирусные HA и NA, были получены от неизвестных птичьих вирусов H7N?/H?N9 предположительно евразийского происхождения (Рисунок 12) [4]. Филогенетический анализ множественных вирусов H7N9 поддерживает как минимум двухэтапную последовательную рекомбинацию для получения вирусов птичьего гриппа A(H7N9).

Первое событие рекомбинации, вероятно, произошло между вирусами, подобными A/brambling/Beijing/16/2012(H9N2), и вирусами H7N?/H?N9 у диких птиц, в результате чего

были получены H7N9-подобные вирусы. Полученные вирусы передавались домашним птицам в Китае. По-видимому, домашние утки действовали как основные промежуточные хозяева и способствовали образованию различных комбинаций вирусов подтипов H7 и N9 или N7 и передавая эти вирусы курам [62]. В начале 2012 года H7N9-подобные вирусы подверглись второй рекомбинации с более свежими вирусами H9N2, которые циркулировали среди домашней птицы в восточном Китае. Вторая рекомбинация привела к появлению различных генотипов новых вирусов H7N9 в Китае, что способствовало быстрому распространению новой реассортантной линии H7N9, которые затем стали источником инфекций кур, а затем и человека [41].

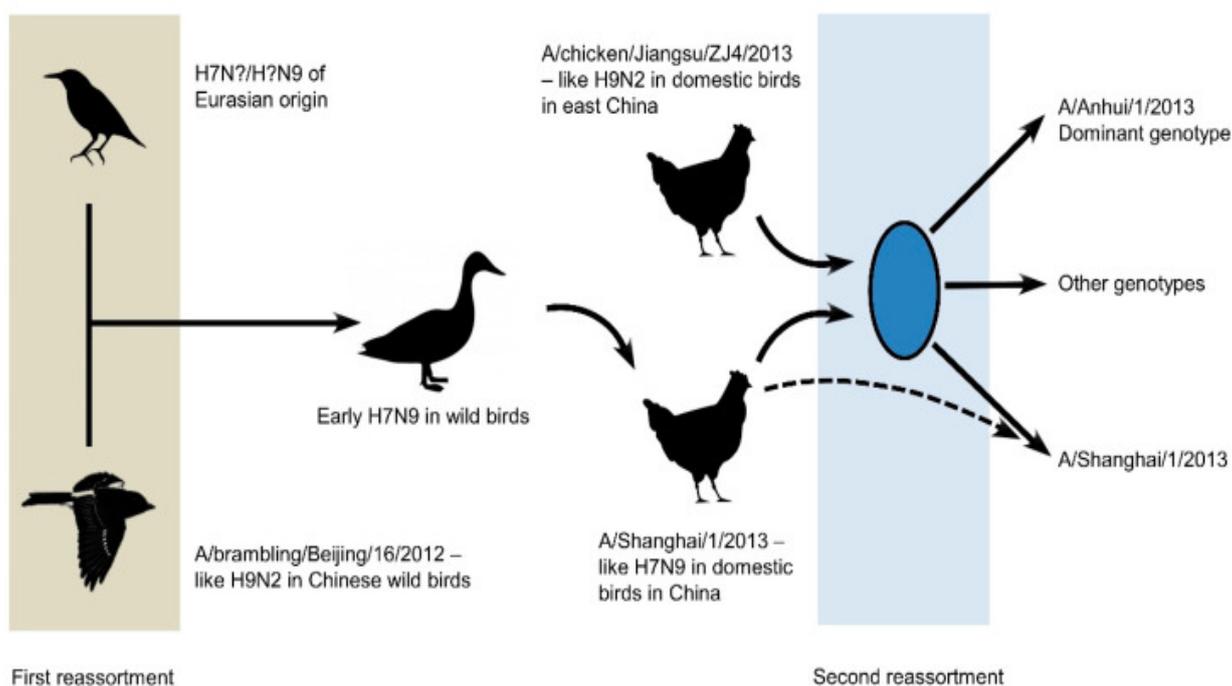


Рисунок 12. Двухэтапная последовательная рекомбинация и появление A/H7N9

В течение первых четырех эпидемических волн вирусы птичьего гриппа A H7N9, циркулирующие среди домашней птицы, были классифицированы как низкопатогенные вирусы птичьего гриппа A H7N9 (вирусы LPAI H7N9) [64]. В конце февраля 2017 года в провинцию Гуандун в Китае у пациентов был выявлен высокопатогенный вирусы гриппа A H7N9. В последующем, HPAI H7N9 быстро распространились в другие регионы. Как и в случае с предыдущими волнами, почти все случаи заражения человека вирусом H7N9 соответствовали контактам с домашней птицей или средами, зараженными вирусом гриппа A H7N9.

Предполагается, что предок (LPIAV H7N9) вируса HPAI H7N9 возник в районе дельты реки Янцзы, а после не раз заносился в район дельты Жемчужной реки.

Анализ последовательностей полных геномов вирусов HPIAV H7N9 выявил высокую степень разнообразия среди шести внутренних генов (PB2, PB1, PA, NP, M и NS), которые были сгруппированы с генами вирусов LPAI H7N9 или H9N2.

Что указывает на то, что в последующем внутренние гены новых вирусов HPAI H7N9 продолжали рекомбинацию с внутренними генами вирусов LPAI H7N9 и вирусов H9N2, что привело к появлению новых генотипов, которые быстро распространились практически по всему Китаю [67]. Варианты HP-H7N9 вызывали вспышки на птицефабриках в нескольких провинциях, таких как Гуандун, Гуанси, Фуцзянь, Хунань, Хэбэй, Тяньцзинь, Пекин, Хэнань, Шаньдун, Шэньси, Внутренняя Монголия и Хэйлунцзян и Юньнань.

У вирусов H7N9, выделенных в 2017 году, в сайте протеолитического расщепления (CS) геагглютинаина (положение 320-321) была обнаружена вставка из четырех аминокислот Lys-Arg-Thr-Ala (KRTA), которая индуцирует вирус H7N9, делая его высокопатогенным для птиц отряда Galliformes [83].

Кроме того, у вирусов HPAI H7N9 наблюдались некоторые изменения, связанные со специфичностью рецепторов. Так, у высокопатогенных вирусов птичьего гриппа H7N9 было выявлено две замены G186V, так и L226Q. Как было описано ранее, замена Q226L в HA связана с переключением специфичности рецептора со специфичности рецептора птичьего типа на специфичность рецептора человеческого типа. Замена G186V в белке HA также способствует увеличению сродства вируса к рецептору человеческого типа [85].

Вирусы HP H7N9 оказались устойчивыми к многим противовирусным препаратам, включая препараты адамантанного ряда и ингибиторы нейраминидазы. Было показано, что вирусы H7N9 пятой волны содержали мутацию S31N в M2, чем и была обусловлена устойчивость к амантадину [84].

Также в нейраминидазе вирусов HPAI H7N9 были обнаружены мутации R292K и E119V, связанные с лекарственной устойчивостью к ингибиторам NA [85], [86]. Причем, замены R292K и E119V, определяющие множественную лекарственную устойчивость, были обнаружены только у изолятов вирусов H7N9 человека, в то время как в вирусах HPAI H7N9, выделенных из окружающей среды, не было обнаружено замен, связанных с устойчивостью к противовирусным препаратам [88].

Высокопатогенный вирус оказал сильное влияние на китайское птицеводство, вызвав высокие показатели смертности у кур. Ко-циркуляция высоко- и низкопатогенных вирусов H7N9 стало причиной заражения, смерти людей. Вирусы LPAI и HPAI H7N9 могут распространяться в большинстве регионов Китая через торговлю птицей и ее перемещение.

LPIAV H7N9 расширил круг хозяев за счет приобретения генов от вирусов утиного гриппа и теперь адаптировался к уткам.

Для того чтобы эффективно контролировать эпидемическую ситуацию с гриппом подтипа H7N9, в Китае с осени 2017 г. проводится комплексная политика иммунизации домашней птицы бивалентной инактивированной вакциной H5/H7 против гриппа подтипа H7N9. Впервые новая бивалентная вакцина H5/H7 была представлена в провинциях Гуандун и Гуанси в июле 2017 года; другие провинции приняли вакцину для домашней птицы к зиме 2017–2018 годов. За период с 2017-2020 год вакцинный штамм дважды меняли.

Вакцинация привела к снижению распространенности вирусов H7N9 среди домашней птицы, и значительному уменьшению случаев заболевания среди людей, предотвратив тем самым «шестую волну» заражения людей вирусом H7N9. Тем не менее, H7N9 продолжает циркулировать и по-прежнему широко распространен среди домашней птицы.

В настоящее время в основном преобладают высокопатогенные штаммы H7N9, претерпевающие интенсивную эволюцию, с момента введения вакцины [87]. Так, было показано, что штаммы 2019 г. образуют независимую небольшую ветвь, предполагая, что гены HA и NA сильно различались по сравнению с генами изолятов предыдущих лет. О быстрой мутации высокопатогенных вирусов H7N9 также свидетельствует увеличение частоты замен нуклеотидов гена HA у изолятов H7N9 2018-2019 года, по сравнению с изолятами пятой волны [89]. Таким образом, хотя вакцинация может в значительной степени контролировать возникновение вспышек вируса H7N9, она также может ускорить появление новых вариантов [90]. В связи с чем, возникает необходимость усиления меры предосторожности в области биобезопасности, с целью предотвращения превращения эпидемии вируса гриппа в пандемию.

Таким образом, несмотря на предпринятые меры, вирусы H7N9 продолжают циркулировать и представлять опасность для человека. Высокопатогенные H7N9 посредством мутаций расширили круг хозяев, за счет приобретения генов от вирусов утиного гриппа и адаптировались к уткам. Это представляет дополнительную угрозу, так как миграция диких водоплавающих птиц может привести межконтинентальному распространению этих вирусов. Формирование отдельной филогенетической ветви вирусами HPAIV H7N9, выделенных от птиц после 2019г от изолятов H7N9, выделенных в 2016-2018 годах, указывает на ускорение эволюции H7N9. Частый антигенный дрейф способствует увеличению разнообразия среди вирусов и появлению новых генотипов, приводит к появлению вирусов измененной антигенной структурой, которые могут ускользнуть от приобретенного иммунитета хозяина, независимо от того, приобретен ли этот иммунитет в результате естественной инфекции или вакцинации. При этом, многое известно об эволюционной изменчивости HA вирусов A/H7N9 [91], тогда как про антигенный дрейф NA меньше данных.

Для поддержания оптимальной защиты с помощью вакцинации преобладающие в настоящее время штаммы вируса гриппа необходимо включать в состав ежегодной противогриппозной вакцины, что требует постоянного мониторинга за изменениями в антигенных структурах вируса H7N9, а также ежегодной переоценки и частых изменений состава вакцины.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1 Материалы исследования

Аминокислотные последовательности

При проведении эволюционного анализа использовались аминокислотные последовательности доступные под следующими инвентарными номерами: CY181515.1, KY64384B.1, KY751124.1, KC853765.1, KF034913.1, KR351274, MF370264.1, NC_026429.1. А также H7N9 клон 2:4, H7N9 клон 2:3.

Штаммы вируса гриппа

Иммунизация подопытных животных и волонтеров проводилась живой гриппозной вакциной на основе холодаадаптированного реассортантного штамма A/17/Ануи/2013/61(H7N9), полученного из коллекции отдела вирусологии ФГБНУ «ИЭМ». Для выявления антинейраминидазных антител в сыворотках крови в работе использовался полученный ранее автором диагностический штамм RN9/13-human A(H6N9), содержащий гемагглютинин нерелевантного для человека вируса гриппа А/серебристая чайка/Сарма/51с/06(H6N1) и нейраминидазу штамма А/Ануи/1/2013(H7N9) потенциально пандемического подтипа. Для выявления антигемагглютинирующих антител в сыворотке крови применяли вакцинный штамм A/17/Ануи/2013/61(H7N9).

Куриные эмбрионы

В данной работе были использованы десятидневные куриные эмбрионы, предоставленные ООО «Племрепродуктор Назия» (пос. Приладожский, Кировский район, Ленинградская обл.).

Исследуемые образцы сывороток крови волонтеров

В качестве объекта исследования были взяты сыворотки крови волонтеров (39 человек) в возрасте 18-49 лет, которым в рамках клинических испытаний двукратно интраназально с интервалом 28 дней вводилось 7,5 Ig ЭИД₅₀/0,5 мл моновалентной ЖГВ на основе аттенуированного штамма потенциально пандемического подтипа A/17/Ануи/2013/61(H7N9).

Образцы сывороток крови вакцинированных лиц и волонтеров из группы плацебо собирали до прививки, на 28 день после первой и второй иммунизации.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Эволюционный анализ последовательностей аминокислот NA

Множественное выравнивание и филогенетический анализ проводилось с помощью программы UGENE компании Юнипро (Новосибирск, Россия) [92].

2.2.2 Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах

Развивающиеся куриные эмбрионы заражали, для этого в аллантоисную полость с помощью шприца вводили 200 мкл вирусосодержащей жидкости и инкубировали при оптимальной температуре (33°C) в течение 48 часов.

Для определения 50%-ой эмбриональной инфекционной активности предварительно делали ряд 10-кратных падающих разведений исследуемого вирусного материала на фосфатно-солевом буфере (ФСБ), которыми впоследствии проводилось заражение из расчета 100 мкл на один РКЭ. После инкубации в течение 48 часов при температуре 33°C 50%-ую эмбриональную инфекционную дозу, выражаемую в lg ЭИД₅₀/мл, рассчитывали по методу Reed-Muench [93].

2.2.3 Концентрирование и очистка вируса в ступенчатом градиенте сахарозы

Вирусосодержащую жидкость из аллантоисной полости инфицированных куриных эмбрионов сначала «осветляли» центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин (центрифуга Rotina 38R, Hettich-zentrifugen). Затем надосадки переносили во флаконы для ультрацентрифугирования и центрифугировали при 17000 об/мин в течение 3-х часов (ультрацентрифуга Beckman coulter Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge, ротор Type 19). Надосадок удаляли, осадок ресуспендировали в 2,0 мл ледяного кальциево-боратного буфера (рН = 7,2). Ресуспендированный вирус наносили на ступенчатый 30/60% градиент сахарозы, приготовленный на кальциево-боратном буфере, с последующим центрифугированием при 20000 об/мин в течение 2,5 часов (ротор SW 40 Ti). Вирусосодержащий слой на границе фаз сахарозы с различной плотностью отбирали и очищали от сахарозы в кальциево-боратном

буфере ультрацентрифугированием при 20000 об/мин в течение 2,5 часов (ротор SW 40 Ti). Осадок ресуспендировали в 1,0 мл кальциево-боратного буфера.

2.2.4 Обработка сывороток крови

Образцы крови мышей отстаивались 1 час при комнатной температуре. Затем следовали центрифугирование проб на 3 тыс. оборотов 15 минут (микроцентрифуга MiniSpin PLUS, Eppendorf) и отбор сыворотки.

Для разрушения термолабильных ингибиторов гемагглютинации все сыворотки прогревали при 56°C в течение 30 мин. Для удаления NA-чувствительных ингибиторов гемагглютинации один объем цельной сыворотки инкубировали 18-20 часов при 37°C в присутствии 3 объемов экстракта нейраминидазы холерных вибрионов (RDE-receptor destroying enzyme, Denka Seiken CO) с последующей инактивацией фермента прогреванием проб на водяной бане при 56°C в течение 1 часа. Второй этап обработки сывороток крови не проводился, если образцы предполагалось использовать для постановки твердофазной реакции ингибирования нейраминидазной активности.

2.2.5 Постановка реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА)

Для определения уровня вирусспецифических антигемагглютинирующих антител в исследуемых образцах использовали РТГА, основанную на способности иммунной сыворотки подавлять склеивание эритроцитов, опосредованное вирусным НА.

Для проведения РТГА использовали: раствор фосфатно-солевого буфера (PBS); 0,75% взвесь куриных эритроцитов; образцы сывороток крови, обработанные RDE

Обработанную RDE и разведенную 1:10, сыворотку крови титровали в коротких рядах 96-луночного полимерного планшета для иммунологических реакций с «U»-дном (ОАО «Фирма Медполимер») для получения серии двукратных разведений (в 50 мкл PBS): 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и тд. Для этого переносили по 50 мкл сыворотки из первого ряда в последующие ряды. После в каждую лунку добавили стандартную дозу вируса (4 агглютинирующие единицы) в объеме 50 мкл.

В течение 30 минут при комнатной температуре добавляли 100 мкл 0,75% взвеси эритроцитов, выдерживали 40 минут при тех же условиях для оседания эритроцитов.

Титр сыворотки определяли, как величину, обратную разведению последней лунки, в которой отсутствует гемагглютинация. Достоверной сероконверсией считался прирост титра антигемагглютинирующих антител в 4 и более раз.

2.2.6 Изучение нейраминидазной активности вирусов гриппа

Проводилась по протоколу, основанному на опубликованной ранее методике С.Р. Lambre et al. [94], включавшему стадии десилизации натурального субстрата (фетуина), сорбированного на полимерном носителе, в присутствии активной НА вируса гриппа; специфического связывания лектина арахиса, конъюгированного с пероксидазой хрена, на демаскированных сахарах; определения количества связавшегося конъюгата по выходу продукта пероксидазной реакции.

Для постановки реакции 96-луночные плоскодонные планшеты для иммуноферментного анализа, обладающие высоким связыванием (кат. номер FEP100096, «Jet Biofil»), покрывали 150 мкл раствора фетуина эмбриональной сыворотки теленка (кат. номер F3004, «Sigma») в концентрации 50 мкг/мл в 0,1 М карбонатном/бикарбонатном буфере (pH = 9,6, кат. номер 2.1.5., ООО «БиолоТ»). Адсорбция субстрата протекала при температуре +4°C в течение ночи. Перед использованием планшеты подвергались двукратной отмывке ФСБ. После этого в лунки планшета вносили 65 мкл двукратных падающих разведений тестируемых вирусов.

. Сиалидазная реакция протекала при 37°C в течение 1 часа. После чего планшеты 4 раза отмывали ФСБ с добавлением твин-20 до концентрации 0,5%, в лунки вносили по 100 мкл меченого пероксидазой лектина арахиса *Arachis hypogaea* (кат. номер L7759, «Sigma») в концентрации 2,5 мкг/мл в ФСБ-БСА. По истечении срока инкубации (1 час при комнатной температуре) планшеты 4 раза отмывали ФСБ с 0,5% твин-20. Проявление пероксидазной реакции проводилось в присутствии 100 мкл субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин (кат. № 555214, TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences,)). Спустя 5 минут ферментативную реакцию останавливали 100 мкл 1Н серной кислоты (ЗАО «Вектон»), результаты считывали на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

2.2.7 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета «Statistica» (версия 6,0) с использованием непараметрических критериев (Манна-Уитни, знаковых рангов Уилкоксона, рангового дисперсионного анализа Фридмана, рангового

дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса). В случае номинальных данных применялся двусторонний вариант точного критерия Фишера. Для представления полученных результатов использовали следующие показатели описательной статистики: среднегеометрические титры (СГТ); для данных, не подчиняющихся нормальному распределению, - медиана (Me) и квартили (Q1; Q3).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1 Филогенетический анализ нейраминидазы вирусов H7N9, выделенных в период 2013-2017г

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена нейраминидазы у вирусов, выделенных в период с 2013 по 2017 г, показало сильную вариабельность в структуре этого антигена. Также, наблюдались существенные различия в нуклеотидной последовательности нейраминидазы вируса A/Anhui/1/2013(H7N9) с последовательностями NA остальных изолятов H7N9, выделенных в различные годы. Однако, частичное сходство в последовательности NA A/Anhui/1/2013(H7N9) было обнаружено с последовательностью NA A/Changsha/2017(H7N9), что указывает на то, что некоторые высокопатогенные прототипы вируса H7N9 2017 года могли появиться в результате антигенного дрейфа NA штаммов вирусов H7N9, появившихся в 2013 года. В то же время, выравнивание аминокислотных последовательностей NA вирусов H7N9 показало высокую степень сходства у всех изолятов. Тем не менее, последовательности вирусов, выделенных в 2017 году, отличались от вирусов, изолированных в 2013-2015 году, по единичным аминокислотным заменам: (I16T), (M72I), (Y166H), (V236A), (S242P), (I300V), (N322S), (A365T).

Филогенетический анализ гликопротеинов N9 вирусов A/H7N9 показал, что вирусы, выделенные в 2017 году вместе с вирусами, выделенными в 2013-2016 гг., образуют отдельную ветвь от A/Anhui/1/2013(H7N9). Это указывает на то, что высокопатогенные вирусы 2017 года эволюционировали от низкопатогенных вирусов H7N9 путем накопления точечных мутаций в антигенных структурах (Рисунок 11).

Примечательно, что клоны H7N9 2017 г, полученные в ФГБНУ «ИЭМ», заняли различные положения на филогенетическом древе. Так H7N9 клон 2:4 сформировал отдельную ветвь, тогда как H7N9 клон 2:3 сформировал филогенетическую ветвь с вирусами, выделенными с 2013 по 2017 год. Различное положение на древе, может быть связано с разными первоисточниками, а также с интенсивной эволюцией, характерной для вирусов, выделенных после 2016 года [38].

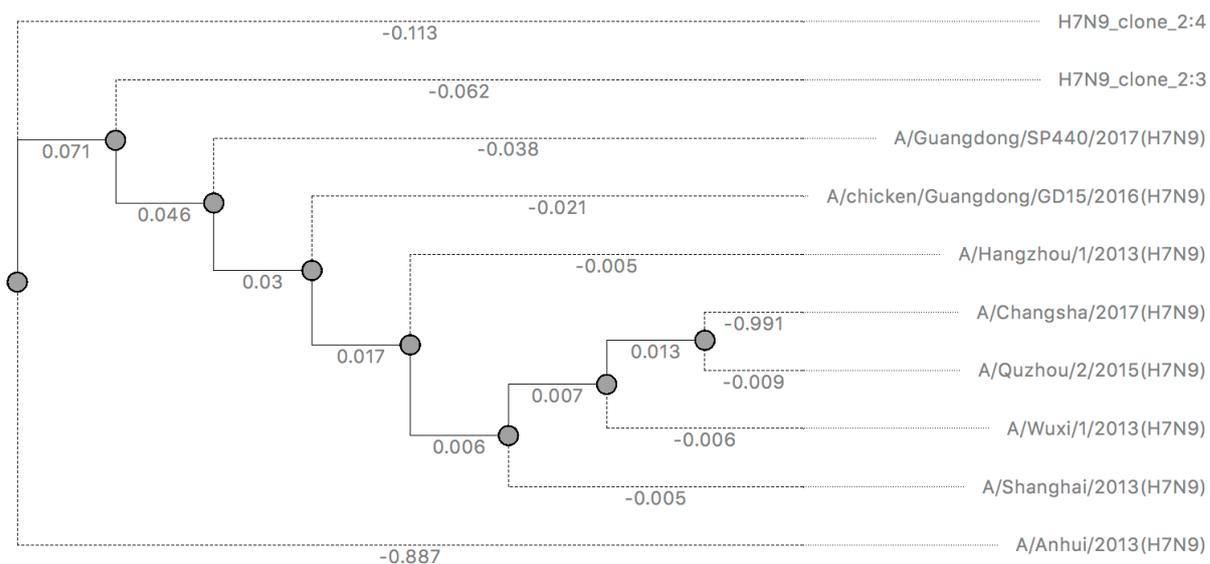


Рисунок 13. Филогенетический анализ гликопротеинов N9 вирусов A/ H7N9

Полученные результаты свидетельствуют о дрейфе генов в гликопротеине NA. Сегментированная природа генома H7N9 делает возможной генетическую рекомбинацию, что и приводит к изменениям в структуре антигенов, таких как NA и HA. Смешение вирусных геномов также увеличивает вирусное разнообразие. Под давлением избирательной окружающей среды происходит быстрая эволюция антигенных структур, что в случае с NA, может способствовать приобретению множественной лекарственной устойчивости NA, повышению ферментативной активности NA и тем самым изменять факторы вирулентности вируса. Возможно, позднее можно будет использовать филогенетический анализ с целью прогнозирования изменений в различных сайтах нейраминидазы с целью контроля и предотвращения развития вирусных инфекций

3.2 Оценка ферментативной активности NA H7N9, выделенных в 2013 и 2017 гг.

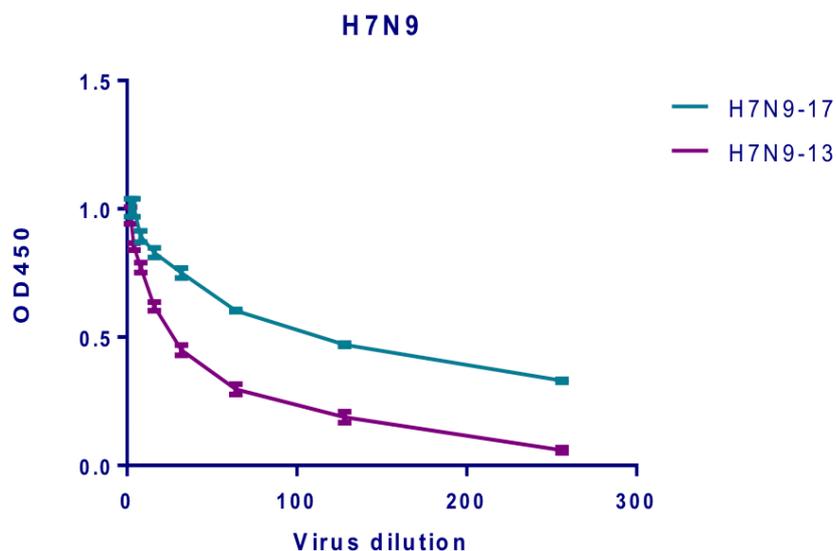


Рисунок 14. Зависимость результата ферментативной реакции от разведения вирусов H6N9-13 и H6N9-17.

При анализе энзиматической активности NA вирусов A/Anhui/1/2013(H7N9) и A/Hong Kong/125/2017(H7N9) с высокомолекулярным субстратом фетуином наблюдались различия в оптической плотности (OD) лунок, содержащих десиализированные участки фетуина, что свидетельствует о различной активности NA вирусов, выделенных в разные годы. Было показано, что активность NA вируса A/Hong Kong/125/2017(H7N9) была примерно в два раза выше активности NA A/Anhui/1/2013(H7N9) (Рисунок 12).

Полученные результаты соотносятся с данными филогенетического анализа и указывают на то, что в нейраминидазе вируса H7N9 2017 года произошли структурные изменения, увеличившие ее ферментативную активность.

3.3 Изучение иммуногенности ЖГВ на основе вирусов А/Н7N9, выделенных в 2013 и 2017 гг.

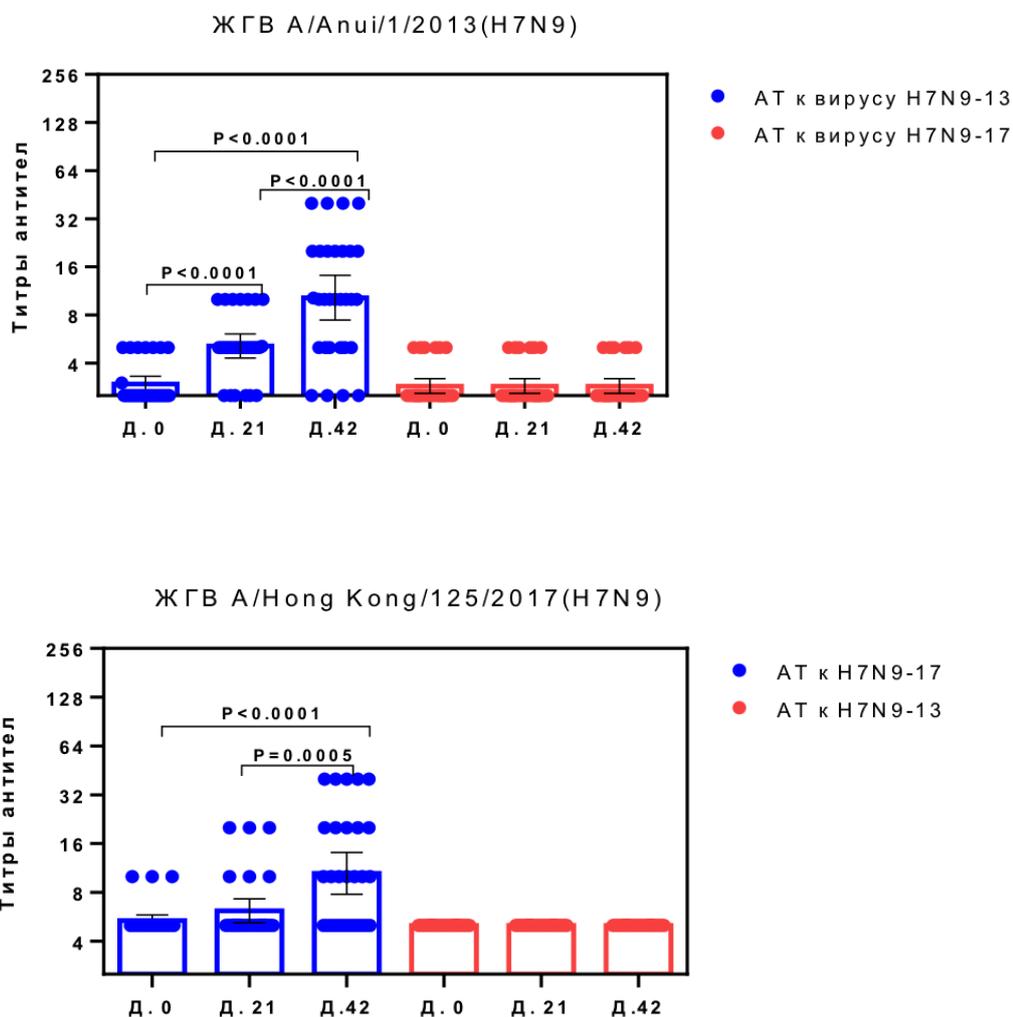


Рисунок 15. Результаты РТГА с сыворотками добровольцев, привитых ЖГВ различных годов. Вакцинация ЖГВ А/Н7N9/13. Вакцинация А/Н7N9/17

С помощью РТГА исследовали образование сывороточных антител после иммунизации ЖГВ на основе вируса гриппа А/Hong Kong/125/2017(H7N9) и А/Anhui/1/2013. Результаты РТГА с сыворотками добровольцев, привитых ЖГВ различных годов представлены на рисунке 13.

При иммунизации ЖГВ как на основе А/Hong Kong/125/2017(H7N9), так и А/Anhui/1/2013 наблюдалось увеличение титра антител. Достоверное увеличение средних титров АТ к вирусу А/Anhui/1/2013(H7N9) и А/Hong Kong/125/2017(H7N9) регистрировалось уже после первой дозы ЖГВ, а вторая доза через 21 день вызвала статистически значимое повышение антител по сравнению с первой дозой. Титры антител после введения второй дозы

ЖГВ на основе A/Hong Kong/125/2017(H7N9) были достоверно выше, чем после введения второй дозы ЖГВ на основе A/Anhui/1/2013(H7N9). При этом, результаты демонстрируют отсутствие перекрестно-реактивных антител, что подтверждает предыдущие выводы про изменение в структуре NA, произошедшее за период с 2013 по 2017 гг.

3.3 Изучение защитной эффективности моноклональных антител (мАТ)

к N9-13 против инфекции вирусом A/H7N9-17

1. Изучение связывания моноклональных антител с вирусом A/H7N9-13

Сравнение оптической плотности серийных разведений мАТ в 96-луночных панелях, сенсibilизированных 20 гемагглютинирующими единицами (ГАЕ) вируса A/H7N9-13, показало более выраженную аффинность для мАТ №8 и меньшее связывание с мАТ №38 и мАТ №40. Кривые связывания различных моноклональных антител с A/H6N9-13 представлены на рисунке 14.

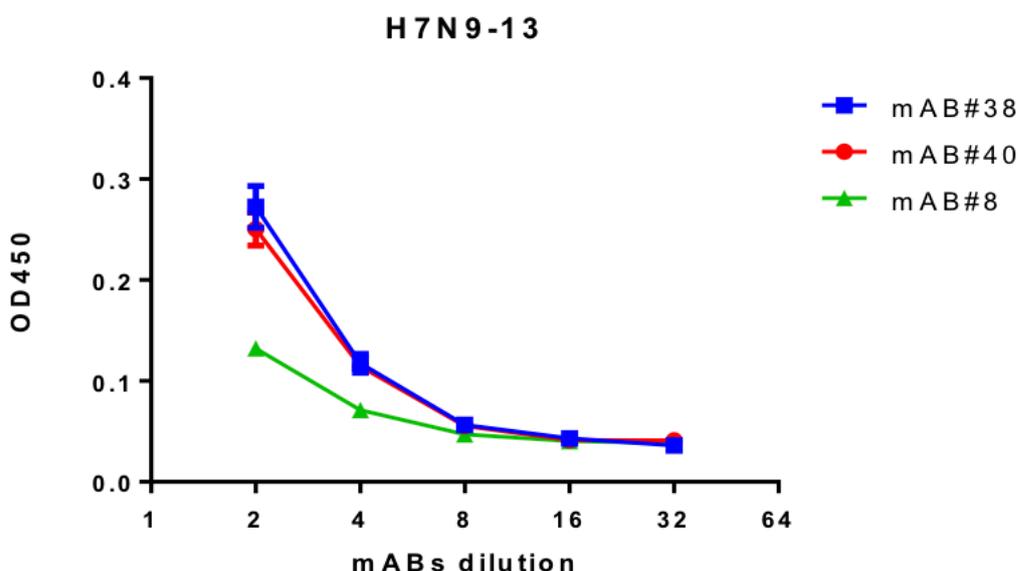


Рисунок 16. Кривые связывания Mabs с вирусом A/H7N9-13.

2. Выявление антител, специфичных к вирусам A/H7N9-13 и A/H7N9-17 в сыворотках крови мышей после пассивной иммунизации моноклональными антителами

При внутрибрюшинном введении мышам смеси мАТ к A/Anhui/1/2013(H7N9) через 5 ч после пассивной иммунизации в крови исследуемых мышей обнаруживались N9-специфические IgG (рисунок 15). При этом, средние уровни IgG к A/Anhui/1/2013(H7N9) NA были выше, чем к A/HongKong/125/2017(H7N9) NA (рисунок 15). А различия между

вакцинированными животными и мышами, получавшими PBS, были статистически значимыми.

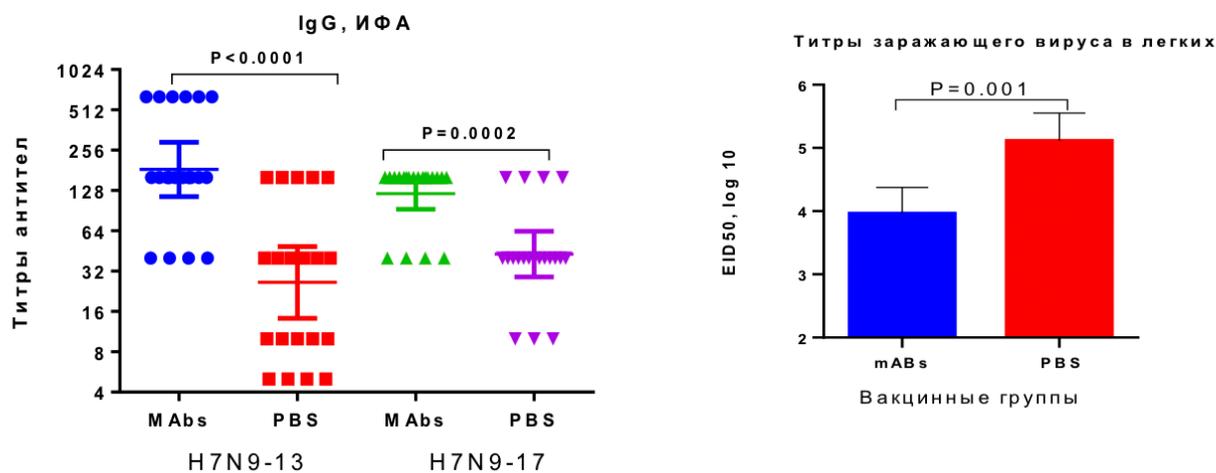


Рисунок 17. Результаты оценки mABs к N9 у мышей. Уровни IgG в сыворотке через 5 часов после иммунизации смесью моноклональных антител (слева). Репродукция инфекционного вируса в легких на пятый день после заражения (справа).

Обнаружение специфических антител к двум вирусам, свидетельствуют о том, что моноклональные антитела, используемые при иммунизации, защищают как от вируса H7N9 2013 года, так и частично защищают от вирусов, выделенных в 2017 году.

Таким образом, введение мАТ оказывало слабое терапевтическое действие, выразившееся в снижении заражающего вируса в легких.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярно-генетический анализ последовательностей нейраминидазы указывает на изменения в антигенной структуре нейраминидазы вирусов H7N9 за период с 2013 по 2017 гг. Филогенетическое древо демонстрирует, что высокопатогенные вирусы 2017 года эволюционировали от низкопатогенных штаммов, путем накопления мутаций в NA.
2. Анализ энзиматической активности нейраминидазы демонстрирует различие в активности NA вирусов, выделенных в разные годы. Так, NA вируса A/Hong Kong/125/2017(H7N9) продемонстрировала более высокую ферментативную активность с высокомолекулярным субстратом фетуином по сравнению с NA H7N9-13.
3. Иммунизация ЖГВ на основе A/Anhui/1/2013(H7N9) и A/Hong Kong/125/2017(H7N9) не вызывают образование перекрестных реактивных антител. Что также указывает на различия в антигенной структуре вирусов 2013 и 2017гг.
4. При пассивной иммунизации моноклональными антителами к A/Anhui/1/2013(H7N9), наблюдалась выработка антител как к вирусу A/Anhui/1/2013(H7N9), так и к A/Hong Kong/125/2017(H7N9). Также пассивная иммунизация способствовала снижению титра вируса в легких. Таким образом, моноклональные антитела к вирусу 2013 года частично защищают организм от вирусов, выделенных в 2017 году, проявляя слабое терапевтическое действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Arranz *u др.*, «The Structure of Native Influenza Virion Ribonucleoproteins», *Science*, т. 338, вып. 6114, сс. 1634–1637, дек. 2012, doi: 10.1126/science.1228172.
2. N. M. Bouvier и P. Palese, «The biology of influenza viruses», *Vaccine*, т. 26, сс. D49–D53, сен. 2008, doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.039.
3. F. Krammer *u др.*, «Influenza», *Nat. Rev. Dis. Primer*, т. 4, вып. 1, с. 3, июн. 2018, doi: 10.1038/s41572-018-0002-y.
4. R. A. Lamb, C. J. Lai, и P. W. Choppin, «Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins.», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, т. 78, вып. 7, сс. 4170–4174, июл. 1981, doi: 10.1073/pnas.78.7.4170.
5. E. Domingo и C. Perales, «Viral quasispecies», *PLOS Genet.*, т. 15, вып. 10, с. e1008271, окт. 2019, doi: 10.1371/journal.pgen.1008271.
6. M. I. Nelson, M. R. Gramer, A. L. Vincent, и E. C. Holmes, «Global transmission of influenza viruses from humans to swine», *J. Gen. Virol.*, т. 93, вып. 10, сс. 2195–2203, окт. 2012, doi: 10.1099/vir.0.044974-0.
7. N. S. Lewis *u др.*, «Antigenic and Genetic Evolution of Equine Influenza A (H3N8) Virus from 1968 to 2007», *J. Virol.*, т. 85, вып. 23, сс. 12742–12749, дек. 2011, doi: 10.1128/JVI.05319-11.
8. R. G. Webster, W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers, и Y. Kawaoka, «Evolution and ecology of influenza A viruses», *Microbiol. Rev.*, т. 56, вып. 1, сс. 152–179, мар. 1992, doi: 10.1128/mr.56.1.152-179.1992.
9. S. Yamada *u др.*, «Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors», *Nature*, т. 444, вып. 7117, сс. 378–382, ноя. 2006, doi: 10.1038/nature05264.
10. R. Gao *u др.*, «Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus», *N. Engl. J. Med.*, т. 368, вып. 20, сс. 1888–1897, май 2013, doi: 10.1056/NEJMoa1304459.
11. M. Matrosovich, N. Zhou, Y. Kawaoka, и R. Webster, «The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans, Chickens, and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties», *J. Virol.*, т. 73, вып. 2, сс. 1146–1155, фев. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.2.1146-1155.1999.
12. J. M. Nicholls, A. J. Bourne, H. Chen, Y. Guan, и J. M. Peiris, «Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses», *Respir. Res.*, т. 8, вып. 1, с. 73, дек. 2007, doi: 10.1186/1465-9921-8-73.
13. [13] K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai, и Y. Kawaoka, «Influenza virus receptors in the human airway», *Nature*, т. 440, вып. 7083, сс. 435–436, мар. 2006, doi: 10.1038/440435a.
14. D. T.-N. Huang *u др.*, «Adaptation of influenza A (H7N9) virus in primary human airway epithelial cells», *Sci. Rep.*, т. 7, вып. 1, с. 11300, сен. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10749-5.
15. K. Tharakaraman *u др.*, «Glycan Receptor Binding of the Influenza A Virus H7N9 Hemagglutinin», *Cell*, т. 153, вып. 7, сс. 1486–1493, июн. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.034.
16. Q. Liu *u др.*, «Analysis of Recombinant H7N9 Wild-Type and Mutant Viruses in Pigs Shows that the Q226L Mutation in HA Is Important for Transmission», *J. Virol.*, т. 88, вып. 14, сс. 8153–8165, июл. 2014, doi: 10.1128/JVI.00894-14.
17. A. L. Vincent, W. Ma, K. M. Lager, B. H. Janke, и J. A. Richt, «Chapter 3 Swine Influenza Viruses», в *Advances in Virus Research*, Elsevier, 2008, сс. 127–154. doi: 10.1016/S0065-3527(08)00403-X.
18. R. P. de Vries *u др.*, «Three mutations switch H7N9 influenza to human-type receptor specificity», *PLOS Pathog.*, т. 13, вып. 6, с. e1006390, июн. 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006390.

19. D. J. Benton, S. A. Wharton, S. R. Martin, и J. W. McCauley, «Role of Neuraminidase in Influenza A(H7N9) Virus Receptor Binding», *J. Virol.*, т. 91, вып. 11, сс. e02293-16, июн. 2017, doi: 10.1128/JVI.02293-16.
20. R. Xu *и др.*, «Functional Balance of the Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Accompanies the Emergence of the 2009 H1N1 Influenza Pandemic», *J. Virol.*, т. 86, вып. 17, сс. 9221–9232, сен. 2012, doi: 10.1128/JVI.00697-12.
21. J. N. Varghese и P. M. Colman, «Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution», *J. Mol. Biol.*, т. 221, вып. 2, сс. 473–486, сен. 1991, doi: 10.1016/0022-2836(91)80068-6.
22. P. M. Colman, «Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies, and inhibitors», *Protein Sci.*, т. 3, вып. 10, сс. 1687–1696, окт. 1994, doi: 10.1002/pro.5560031007.
23. J. N. Varghese, W. G. Laver, и P. M. Colman, «Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution», *Nature*, т. 303, вып. 5912, сс. 35–40, май 1983, doi: 10.1038/303035a0.
24. W. P. Burmeister, S. Cusack, и R. W. H. Ruigrok, «Calcium is needed for the thermostability of influenza B virus neuraminidase», *J. Gen. Virol.*, т. 75, вып. 2, сс. 381–388, фев. 1994, doi: 10.1099/0022-1317-75-2-381.
25. P. M. Colman, J. N. Varghese, и W. G. Laver, «Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase», *Nature*, т. 303, вып. 5912, сс. 41–44, май 1983, doi: 10.1038/303041a0.
26. L. V. Gubareva *и др.*, «Drug Susceptibility Evaluation of an Influenza A(H7N9) Virus by Analyzing Recombinant Neuraminidase Proteins», *J. Infect. Dis.*, т. 216, вып. suppl_4, сс. S566–S574, сен. 2017, doi: 10.1093/infdis/jiw625.
27. S. Li, J. Schulman, S. Itamura, и P. Palese, «Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus», *J. Virol.*, т. 67, вып. 11, сс. 6667–6673, ноя. 1993, doi: 10.1128/jvi.67.11.6667-6673.1993.
28. J. N. Varghese, V. Chandana Epa, и P. M. Colman, «Three-dimensional structure of the complex of 4-guanidino-Neu5Ac2en and influenza virus neuraminidase: Anti-influenza drug/influenza neuraminidase complex», *Protein Sci.*, т. 4, вып. 6, сс. 1081–1087, июн. 1995, doi: 10.1002/pro.5560040606.
29. R. J. Russell *и др.*, «The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design», *Nature*, т. 443, вып. 7107, сс. 45–49, сен. 2006, doi: 10.1038/nature05114.
30. W. G. Laver, P. M. Colman, R. G. Webster, V. S. Hinshaw, и G. M. Air, «Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity», *Virology*, т. 137, вып. 2, сс. 314–323, сен. 1984, doi: 10.1016/0042-6822(84)90223-X.
31. J. Uhlenhorff, T. Matrosovich, H.-D. Klenk, и M. Matrosovich, «Functional significance of the hemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses», *Arch. Virol.*, т. 154, вып. 6, сс. 945–957, июн. 2009, doi: 10.1007/s00705-009-0393-x.
32. M. Dai *и др.*, «Mutation of the Second Sialic Acid-Binding Site, Resulting in Reduced Neuraminidase Activity, Preceded the Emergence of H7N9 Influenza A Virus», *J. Virol.*, т. 91, вып. 9, сс. e00049-17, май 2017, doi: 10.1128/JVI.00049-17.
33. R. Gao *и др.*, «Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus», *N. Engl. J. Med.*, т. 368, вып. 20, сс. 1888–1897, май 2013, doi: 10.1056/NEJMoa1304459.
34. Y. Matsuoka *и др.*, «Neuraminidase Stalk Length and Additional Glycosylation of the Hemagglutinin Influence the Virulence of Influenza H5N1 Viruses for Mice», *J. Virol.*, т. 83, вып. 9, сс. 4704–4708, май 2009, doi: 10.1128/JVI.01987-08.
35. Y. Sun *и др.*, «Amino Acid 316 of Hemagglutinin and the Neuraminidase Stalk Length Influence Virulence of H9N2 Influenza Virus in Chickens and Mice», *J. Virol.*, т. 87, вып. 5, сс. 2963–2968, мар. 2013, doi: 10.1128/JVI.02688-12.
36. E. M. Sorrell, H. Song, L. Pena, и D. R. Perez, «A 27-Amino-Acid Deletion in the

- Neuraminidase Stalk Supports Replication of an Avian H2N2 Influenza A Virus in the Respiratory Tract of Chickens», *J. Virol.*, т. 84, вып. 22, сс. 11831–11840, ноя. 2010, doi: 10.1128/JVI.01460-10.
37. H. Zhou *и др.*, «The Special Neuraminidase Stalk-Motif Responsible for Increased Virulence and Pathogenesis of H5N1 Influenza A Virus», *PLoS ONE*, т. 4, вып. 7, с. e6277, июл. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006277.
 38. Y. Bi *и др.*, «Changes in the Length of the Neuraminidase Stalk Region Impact H7N9 Virulence in Mice», *J. Virol.*, т. 90, вып. 4, сс. 2142–2149, фев. 2016, doi: 10.1128/JVI.02553-15.
 39. L. Chen *и др.*, «Could A Deletion in Neuraminidase Stalk Strengthen Human Tropism of the Novel Avian Influenza Virus H7N9 in China, 2013?», *Int. J. Environ. Res. Public Health*, т. 12, вып. 1, сс. 1020–1028, янв. 2015, doi: 10.3390/ijerph120101020.
 40. S. Munier *и др.*, «A Genetically Engineered Waterfowl Influenza Virus with a Deletion in the Stalk of the Neuraminidase Has Increased Virulence for Chickens», *J. Virol.*, т. 84, вып. 2, сс. 940–952, янв. 2010, doi: 10.1128/JVI.01581-09.
 41. Q. Wang, J. Long, S. Hu, Y. Wu, и X. Liu, «[Biological significance of amino acids deletion in NA stalk of H5N1 avian influenza virus]», *Wei Sheng Wu Xue Bao*, т. 46, вып. 4, сс. 542–546, авг. 2006.
 42. J. D. Durrant, R. M. Bush, и R. E. Amaro, «Microsecond Molecular Dynamics Simulations of Influenza Neuraminidase Suggest a Mechanism for the Increased Virulence of Stalk-Deletion Mutants», *J. Phys. Chem. B*, т. 120, вып. 33, сс. 8590–8599, авг. 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b02655.
 43. M. Hussain, H. Galvin, T. Y. Haw, A. Nutsford, и M. Husain, «Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management», *Infect. Drug Resist.*, т. Volume 10, сс. 121–134, апр. 2017, doi: 10.2147/IDR.S105473.
 44. A. C. Hurt, P. Selleck, N. Komadina, R. Shaw, L. Brown, и I. G. Barr, «Susceptibility of highly pathogenic A(H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes», *Antiviral Res.*, т. 73, вып. 3, сс. 228–231, мар. 2007, doi: 10.1016/j.antiviral.2006.10.004.
 45. A. Moscona, «Global Transmission of Oseltamivir-Resistant Influenza», *N. Engl. J. Med.*, т. 360, вып. 10, сс. 953–956, мар. 2009, doi: 10.1056/NEJMp0900648.
 46. H. T. Nguyen, A. M. Fry, и L. V. Gubareva, «Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods», *Antivir. Ther.*, т. 17, вып. 1 Pt B, сс. 159–173, 2012, doi: 10.3851/IMP2067.
 47. J. L. McKimm-Breschkin *и др.*, «Mutations in a Conserved Residue in the Influenza Virus Neuraminidase Active Site Decreases Sensitivity to Neu5Ac2en-Derived Inhibitors», *J. Virol.*, т. 72, вып. 3, сс. 2456–2462, мар. 1998, doi: 10.1128/JVI.72.3.2456-2462.1998.
 48. Y. Qi *и др.*, «A novel pyrosequencing assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistance-conferring mutations among clinical isolates of avian H7N9 influenza virus», *Virus Res.*, т. 179, сс. 119–124, янв. 2014, doi: 10.1016/j.virusres.2013.10.026.
 49. C.-K. Mok *и др.*, «Pyrosequencing reveals an oseltamivir-resistant marker in the quasispecies of avian influenza A (H7N9) virus», *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, т. 48, вып. 4, сс. 465–469, авг. 2015, doi: 10.1016/j.jmii.2013.09.010.
 50. M. Kiso *и др.*, «Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study», *The Lancet*, т. 364, вып. 9436, сс. 759–765, авг. 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16934-1.
 51. D. Tamura *и др.*, «Frequency of Drug-resistant Viruses and Virus Shedding in Pediatric Influenza Patients Treated With Neuraminidase Inhibitors», *Clin. Infect. Dis.*, т. 52, вып. 4, сс. 432–437, фев. 2011, doi: 10.1093/cid/ciq183.
 52. Y. Hu *и др.*, «Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance», *The Lancet*, т. 381, вып. 9885, сс. 2273–2279, июн. 2013, doi: 10.1016/S0140-

- 6736(13)61125-3.
53. Y. Wu *u dp.*, «Resistance to Mutant Group 2 Influenza Virus Neuraminidases of an Oseltamivir-Zanamivir Hybrid Inhibitor», *J. Virol.*, т. 90, вып. 23, сс. 10693–10700, дек. 2016, doi: 10.1128/JVI.01703-16.
 54. Y. Wu *u dp.*, «Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses», *Cell Res.*, т. 23, вып. 12, сс. 1347–1355, дек. 2013, doi: 10.1038/cr.2013.144.
 55. J. A. Belser, C. B. Bridges, J. M. Katz, и Т. М. Tumpey, «Past, Present, and Possible Future Human Infection with Influenza Virus A Subtype H7», *Emerg. Infect. Dis.*, т. 15, вып. 6, сс. 859–865, июн. 2009, doi: 10.3201/eid1506.090072.
 56. J. Liu *u dp.*, «H7N9: a low pathogenic avian influenza A virus infecting humans», *Curr. Opin. Virol.*, т. 5, сс. 91–97, апр. 2014, doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.001.
 57. G. F. Gao и Y. Wu, «Haunted with and hunting for viruses», *Sci. China Life Sci.*, т. 56, вып. 8, сс. 675–677, авг. 2013, doi: 10.1007/s11427-013-4525-x.
 58. N. Xiang *u dp.*, «Assessing Change in Avian Influenza A(H7N9) Virus Infections During the Fourth Epidemic — China, September 2015–August 2016», *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, т. 65, вып. 49, сс. 1390–1394, дек. 2016, doi: 10.15585/mmwr.mm6549a2.
 59. L. Cui *u dp.*, «Dynamic reassortments and genetic heterogeneity of the human-infecting influenza A (H7N9) virus», *Nat. Commun.*, т. 5, вып. 1, с. 3142, янв. 2014, doi: 10.1038/ncomms4142.
 60. Y. Bi *u dp.*, «Genesis, Evolution and Prevalence of H5N6 Avian Influenza Viruses in China», *Cell Host Microbe*, т. 20, вып. 6, сс. 810–821, дек. 2016, doi: 10.1016/j.chom.2016.10.022.
 61. W. Shi, J. Li, H. Zhou, и G. F. Gao, «Pathogen genomic surveillance elucidates the origins, transmission and evolution of emerging viral agents in China», *Sci. China Life Sci.*, т. 60, вып. 12, сс. 1317–1330, дек. 2017, doi: 10.1007/s11427-017-9211-0.
 62. Т. Т.-Y. Lam *u dp.*, «The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China», *Nature*, т. 502, вып. 7470, сс. 241–244, окт. 2013, doi: 10.1038/nature12515.
 63. A. Wu *u dp.*, «Sequential Reassortments Underlie Diverse Influenza H7N9 Genotypes in China», *Cell Host Microbe*, т. 14, вып. 4, сс. 446–452, окт. 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.09.001.
 64. Q. Zhang *u dp.*, «H7N9 Influenza Viruses Are Transmissible in Ferrets by Respiratory Droplet», *Science*, т. 341, вып. 6144, сс. 410–414, июл. 2013, doi: 10.1126/science.1240532.
 65. D. Wang *u dp.*, «Two Outbreak Sources of Influenza A (H7N9) Viruses Have Been Established in China», *J. Virol.*, т. 90, вып. 12, сс. 5561–5573, июн. 2016, doi: 10.1128/JVI.03173-15.
 66. D. Wang *u dp.*, «Genetic tuning of the novel avian influenza A(H7N9) virus during interspecies transmission, China, 2013», *Eurosurveillance*, т. 19, вып. 25, июн. 2014, doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.25.20836.
 67. L. Yang *u dp.*, «Genesis and Spread of Newly Emerged Highly Pathogenic H7N9 Avian Viruses in Mainland China», *J. Virol.*, т. 91, вып. 23, сс. e01277-17, дек. 2017, doi: 10.1128/JVI.01277-17.
 68. Shi J et al., Deng G, Ma S, Zeng X, Yin X, Li M, Zhang B, Cui P, Chen Y, Yang H, Wan X, Liu L, Chen P, Jiang Y, Guan Y, Liu J, Gu W, Han S, Song Y, Liang L, Qu Z, Hou Y, Wang X, Bao H, Tian G, Li Y, Jiang L, Li C, Chen H. Rapid Evolution of H7N9 Highly Pathogenic Viruses that Emerged in China in 2017. *Cell Host Microbe*. 2018 Oct 10;24(4):558-568.e7. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.006.
 69. Gao GF et al. From "A"IV to "Z"IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. *Cell*. 2018 Mar 8;172(6):1157-1159. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.025
 70. Chen Y, Liang W, Yang S, Wu N, Gao H, Sheng J, Yao H, Wo J, Fang Q, Cui D, Li Y, Yao X, Zhang Y, Wu H, Zheng S, Diao H, Xia S, Zhang Y, Chan KH, Tsoi HW, Teng JL, Song W, Wang P, Lau SY, Zheng M, Chan JF, To KK, Chen H, Li L, Yuen KY. Human infections with

the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. *Lancet*. 2013 Jun 1;381(9881):1916-25. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60903-4.

71. Belser, J., Gustin, K., Pearce, M. et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* 501, 556–559 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12391>.
72. Norkin, L.C. Orthomyxoviruses / L.C. Norkin // In: *Virology. Molecular biology and pathogenesis*. - 2010. - Washington DC, USA: Asm Press American Society Microbiol. - P. 296-345.
73. Paragas, J. Influenza B and C Virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities / J. Paragas, J. Talon, R.E. O'Neill et al. // *J. Virol.* - 2001. - 75 (16). - P. 7375-7383.
74. Paterson, D. Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP) / D. Paterson, E. Fodor // *PLOS Pathogens*. - 2012. - 8 (12). - P. 1-8.
75. Shaw, M.L., Palese, P. Orthomyxoviruses: Molecular Biology//M.L. Shaw, P. Palese. / *Encyclopedia of virology*. Third edition. Amsterdam - Boston - Heidelberg - London - New York - Oxford -Paris - San Diego - San Francisco - Singapore - Sydney - Tokyo: Elsevier Academic Press; - 2008. - P. - 485-494.
76. Jayaraman A, Pappas C, Raman R, Belser JA, Viswanathan K, Shriver Z, Tumpey TM, Sasisekharan R. A single base-pair change in 2009 H1N1 hemagglutinin increases human receptor affinity and leads to efficient airborne viral transmission in ferrets. *PLoS one*. 2011;6:e17616.
77. Colman P.M. NA enzyme and antigen. In: Sasaki Y, editor. *The influenza viruses*. New York: Plenum Publishing Corporation; 1989. pp. 175–218.
78. Air GM et al. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses*. 2012 Jul;6(4):245-56. doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00304.x. Epub 2011 Nov 16.
79. Varghese JN, Colman PM, van Donkelaar A, Blick TJ, Sahasrabudhe A, McKimm-Breschkin JL. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 28;94(22):11808-12. doi: 10.1073/pnas.94.22.11808. PMID: 9342319; PMCID: PMC23599.
80. World Health Organization. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility—Geneva, November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 87:369–74.
81. Zhang F, Bi Y, Wang J, Wong G, Shi W, Hu F, Yang Y, Yang L, Deng X, Jiang S, He X, Liu Y, Yin C, Zhong N, Gao GF. 2017. Human infections with recently-emerging highly pathogenic H7N9 avian influenza virus in China. *J Infect* 75:71–75. doi: 10.1016/j.jinf.2017.04.001.
82. Zhu, Wenfei et al. “Biological characterisation of the emerged highly pathogenic avian influenza (HPAI) A(H7N9) viruses in humans, in mainland China, 2016 to 2017.” *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* vol. 22,19 (2017): 30533. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.19.30533.
83. Zhu W, Zhou J, Li Z, Yang L, Li X, Huang W, Zou S, Chen W, Wei H, Tang J, Liu L, Dong J, Wang D, Shu Y. 2017. Biological characterisation of the emerged highly pathogenic avian influenza (HPAI) A(H7N9) viruses in humans, in mainland China, 2016 to 2017. *Euro Surveill* 22(19):pii=30533. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.19.30533.
84. Jiang, Wenming et al. “Antigenic Variant of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, China, 2019.” *Emerging infectious diseases*, vol. 26,2 379–380. 17 Feb. 2020, doi:10.3201/eid2602.191105
85. Ke C, Mok CKP, Zhu W, Zhou H, He J, Guan W, Wu J, Song W, Wang D, Liu J, Lin Q, Chu DKW, Yang L, Zhong N, Yang Z, Shu Y, Peiris JSM. 2017. Human infection with highly pathogenic avian influenza A(H7N9) virus, China. *Emerg Infect Dis* 23:1332–1340. doi: 10.3201/eid2308.170600.
86. Yang JR, Liu MT. 2017. Human infection caused by an avian influenza A (H7N9) virus with a

- polybasic cleavage site in Taiwan, 2017. *J Formos Med Assoc* 116:210–212. doi: 10.1016/j.jfma.2017.02.011.
87. JShi JZ, Deng GH, Ma SJ, Zeng XY, Yin X, Li M, Zhang B, Cui PF, Chen Y, Yang HL, Wan XP, Liu LL, Chen PC, Jiang YP, Guan YT, Liu JX, Gu WL, Han SY, Song YM, Liang LB, Qu ZY, Hou YJ, Wang XR, Bao HM, Tian GB, Li YB, Jiang L, Li CJ, Chen HL. Rapid evolution of H7N9 highly pathogenic viruses that emerged in China in 2017. *Cell Host Microbe*. 2018;24:558–568.e7. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.006. iang W, Hou G, Li J, Peng C, Wang S, Liu S, Zhuang Q, Yuan L, Yu X, Li Y, Wang J, Liu H. Antigenic variant of highly pathogenic avian influenza A(H7N9) virus China 2019. *Emerg Infect Dis*. 2020;26:379. doi: 10.3201/eid2602.191105.
 88. Wu Y, Bi Y, Vavricka CJ, Sun X, Zhang Y, Gao F, Zhao M, Xiao H, Qin C, He J, Liu W, Yan J, Qi J, Gao GF. 2013. Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses. *Cell Res* 23:1347–1355.
 89. Wu, Yifan et al. “Accelerated Evolution of H7N9 Subtype Influenza Virus under Vaccination Pressure.” *Virologica Sinica* vol. 36,5 (2021): 1124-1132. doi:10.1007/s12250-021-00383-x.
 90. Lee, Chang-Won et al. “Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus.” *Journal of virology* vol. 78,15 (2004): 8372-81. doi:10.1128/JVI.78.15.8372-8381.2004.
 91. Ning T, Nie J, Huang W, Li C, Li X, Liu Q, Zhao H, Wang Y. Antigenic Drift of Influenza A(H7N9) Virus Hemagglutinin. *J Infect Dis*. 2019 Jan 1;219(1):19-25. doi: 10.1093/infdis/jiy408.
 92. Konstantin Okonechnikov and others, Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics*, Volume 28, Issue 8, April 2012, Pages 1166–1167.
 93. L.J. REED , H. MUENCH, A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS, *American Journal of Epidemiology*, Volume 27, Issue 3, May 1938, Pages 493–497.
 94. Lambré CR, Terzidis H, Greffard A, Webster RG. An enzyme-linked lectin assay for sialidase. *Clin Chim Acta*. 1991 May 15;198(3):183-93. doi: 10.1016/0009-8981(91)90352-d.
 95. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Types of influenza viruses. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.