

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРІАБЕЛЬНОСТІ ЕПІДЕМІЧНО АКТИВНИХ ШТАМІВ ВІРУСУ КОРУ, ЦИРКУЛЮЮЧИХ У ПІВНІЧНО- СХІДНОМУ РЕГІОНІ УКРАЇНИ

Мелентьєва Х. В., Калініченко С. В., Торяник І. І.,  
Мінухін В.В., Моїсеєнко Т.М.

Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.  
Мечникова Національної академії медичних наук  
України

### Вступ

Для відстеження шляхів передачі вірусу кору [0] і диференціації поствакцинальних ускладнень від випадків захворювання, викликаних інфікуванням штамми «дикого» [2] типу, використовують генотипування виділених ізолятів вірусу кору циркулюючих на певній території. Існують спеціальні програми ВООЗ та ЮНЕСКО (WHO-UNICEF, 2002), спрямовані на елімінацію вірусу кору. Для кожного регіону можна виділити характерні штамми, які є еталонними на даний час.

Еталонні, це штамми історично ізольовані першими або відображають гетерогенність представників, що циркулюють останнім часом. На початку 1990-х в Європі були виявлені лише два генотипа ВК (С2 та D6), які були поширені у всьому регіоні і тому їх називають корінними Європейськими генотипами [3, 4, 5, 6, 7]. Ці генотипи були характерні і для території України, в тому числі і Північно-Східного регіону. Згодом спостерігалася зникнення генотипів С2 та D6 в період між 2000 і 2007 роками, що збіглося з початком періоду послідовних циклів ініціації та припинення тривалої передачі різних імпортованих генотипів, наприклад як у Німеччині та інших країнах Європи [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. В Україні з'явилися генотипи В3, D4, D5, D7 і D8, які походили з ендемічних районів за кордоном та ініціювали великі спалахи в Європі [8, 9, 16]. Для визначення епідеміологічно важливих варіантів послідовностей ВК в Північно-східному регіоні

України ми узагальнили дані з баз MeaNS щодо переважаючих штамів які назвали «названими штамми» генотипів, а саме D8 і В3, проаналізувавши їх філогенез (область N-450 нуклеотиди). Ендемічний на Північно-східному регіоні України генотип В3 був часто імпортований і до країн Європи [17, 18, 19]. Відомо, що велика кількість з «названих штамів», представлені цим генотипом. Найресповсюдженішими штамми на території Північно-Східного регіону України в період з 2017 року вважають Gir Somath D8, Cambridg D8 та Kabul B3.

### Матеріали та методи

Молекулярна програма зовнішньої оцінки якості ВООЗ, Централізована інформаційна система інфекційних хвороб ВООЗ EUR, бази даних наглядів за кором ВООЗ. Статистичні дані та звітні форми щодо проведених епідеміологічних, вірусологічних та серологічних досліджень на корову інфекцію у Харківській області за 2017-2020 рр., предоставлені ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України». Висхідний (агломеративний) метод кластеризації Neighbor-Joining для створення філогенетичних дерев та програма MADx 10 [20].

Нами були проаналізовані генетичні співвідносини та еволюційні відстані між близькоспорідними штамми генотипу В3 (рисунок 1). Для цього, використовуючи останню версію програми MADx, за допомогою якої можливо співставити данні з серверів по всьому світі, ми побудували генеалогічне древо філогенетичних послідовностей близькоспорідних штамів генотипу В3. З рисунку 1 видно, що від визначеної лінії Edmonston-Zagreb генеалогічне древо росте у східчастому характері, але утворює кілька важливих кореневих вузлів в області MVsB3CaliforniaUSA, MVsB3PadovaITA та MVsB3LondonGBR, які з мінімальними генетичними відмінностями дають початок великій кількості Європейських штамів вірусу кору.

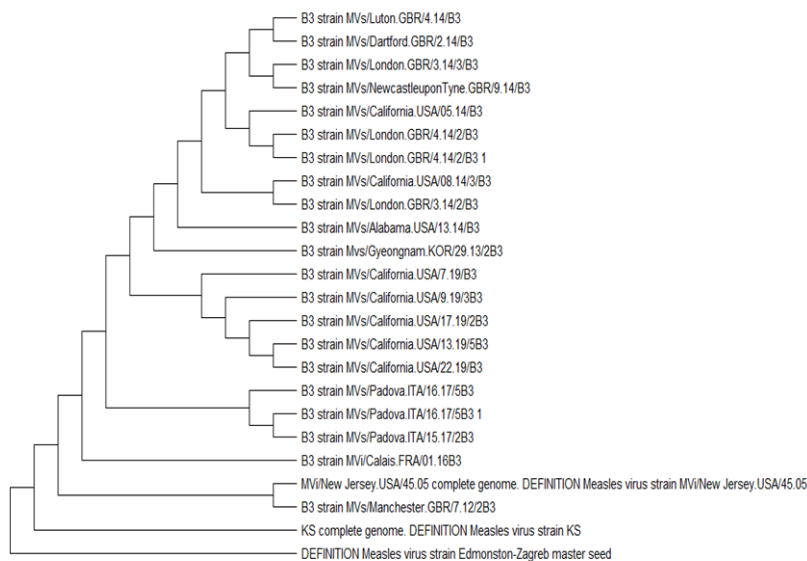
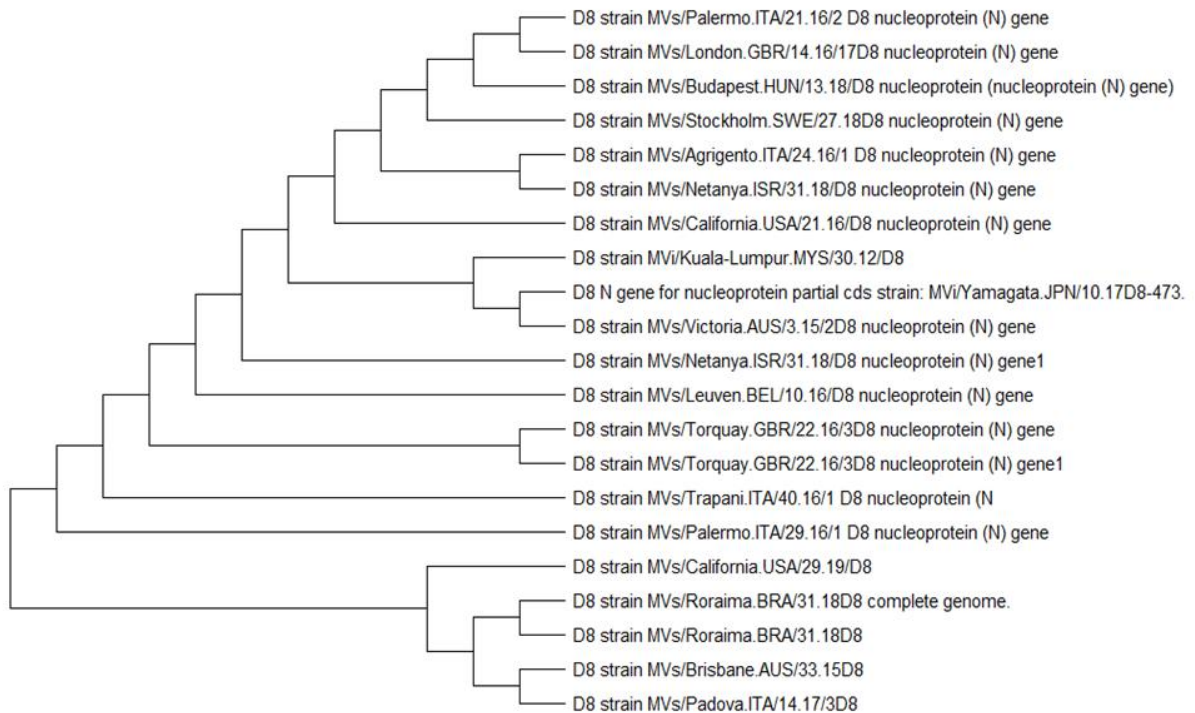


Рисунок 1 - Еволюційні взаємовідносини таксонів генотипу В3 вірусу кору.

**Примітка.** Історія еволюції була виведена з використанням методу Neighbor-Joining [20]. Показано оптимальне древо штамів послідовностей. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу Метод корекції Пуассона Poisson correction method [15] та виражені в одиницях кількості амінокислотних замін на сайт. У цьому аналізі брала участь 24 нуклеотидна послідовність. Кодуючі послідовності включали 1-й + 2-й + 3-й + некодуючий. Усі неоднозначні позиції були видалені за кожною парою послідовностей (варіант попарного видалення). В остаточному наборі даних було всього 14172 позиції. Еволюційний аналіз проводився за допомогою програми MEGA X [21].

Як бачимо з рисунку 1, B3 strain MVs PadovaITA16.17/5B3, має коріння з іншими ендемічними для України та країн Європи штамми, такими як California в різних таксономічних варіаціях та інші. До речі, MVs Padova ITA 16 17/5 генотипу B3 є близькоспорідненим з штамми генотипу D 8, D8 strain MVs Padova ITI 14/17/3D8. Даний штам MVs Padova ITI 14/17/3D8 є відгалуженням ендемічного на території України штамму Cambridge. На рисунку 2 представлені еволюційні взаємини таксонів штамму MVs/Cambridge.GBR/17.16 генотипу D8, гени нуклеопротеїну (N), часткові cds.



**Рисунок 2 - Філогенетичні взаємовідносини в межах MVs/Cambridge.GBR/17.16 [D8] генотипу вірусу кору D8, штам за нуклеопротеїном (N), часткові cds.**

**Примітка.** Історія еволюції була виведена з використанням методу Neighbor-Joining [20]. Показано оптимальне древо штамів послідовностей. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу Метод корекції Пуассона Poisson correction method [15] та виражені в одиницях кількості амінокислотних замін на сайт. У цьому аналізі брала участь 21 нуклеотидна послідовність. Кодуючі послідовності включали 1-й + 2-й + 3-й + некодуючий. Усі неоднозначні позиції були видалені з кожної пари послідовностей (варіант попарного видалення). В остаточному наборі даних було всього 12 573 позиції. Еволюційний аналіз проводився в MEGA X [21].

З рисунку 2 видно, що штам MVsD8CaliforniaUSA та MVsD8PadovaITA, в межах відгалуження MVsD8/CambridgeGBR, є кореневими вузлами, які дають початок генетичному розгалуженню з великою кількістю послідовних генетичних змін і поступового східчастого утворення термінальних вузлів з корінням з США та Італії до великої різноманітності країн Європи [22, 23].

Проаналізувавши філогенетичні відносини та еволюційні відстані послідовностей в межах MVs/Cambridge.GBR D8 можна констатувати близько спорідненість і з штамми B3, що доводить належність всіх відгалужень вірусу до одного серотипу [24, 25, 26]. Бачимо, що ендемічний для України MVs/Cambridge.GBR D8 характеризується філогенетичною різноманітністю і має коріння в багатьох країнах Європи.

За епідеміологічною довідкою ВООЗ щодо геномної послідовності 2345 випадків внесених в базу даних нуклеотидних послідовностей вірусів кору (MeaNS) в Італії, Сербії, Греції, Франції та Україні виявлено такі генотипи: D8 (n=1196), B3 (1144), H1 (28) та D4 [5]. Переважним варіантом генотипу D8 був Herborn.DEU/05.17/ (54% всіх варіантів D8), також були виявлені такі домінуючі штамми генотипу B3: Dublin.IRL/8.16/ (37% усіх варіантів B3) та MVs/Saint Denis.FRA/36.17 (33%) [2727, 28].

Ці данні та дані отримані нами говорять про високу мутагенність та отже, генетичну різноманітність вірусу кору. Нами було побудовано генеалогічне древо філогенетичної спорідненості штамів генотипу D8 вірусу кору (рисунок 3). Якщо розглядати штамі MVsD8GirSomnath як кореневий вузол, який характеризується найбільшою частотою

зустрічальності в Північно-східному регіоні України, бачимо що він є родоначальником генетичної гілки з двома розгалуженнями з внутрішніми та термінальними вузлами, одна з яких дає початок великій різноманітності послідовностей MVsD8 California, а інша переважно штамам першочергово виявленим в Індії [12, 29].

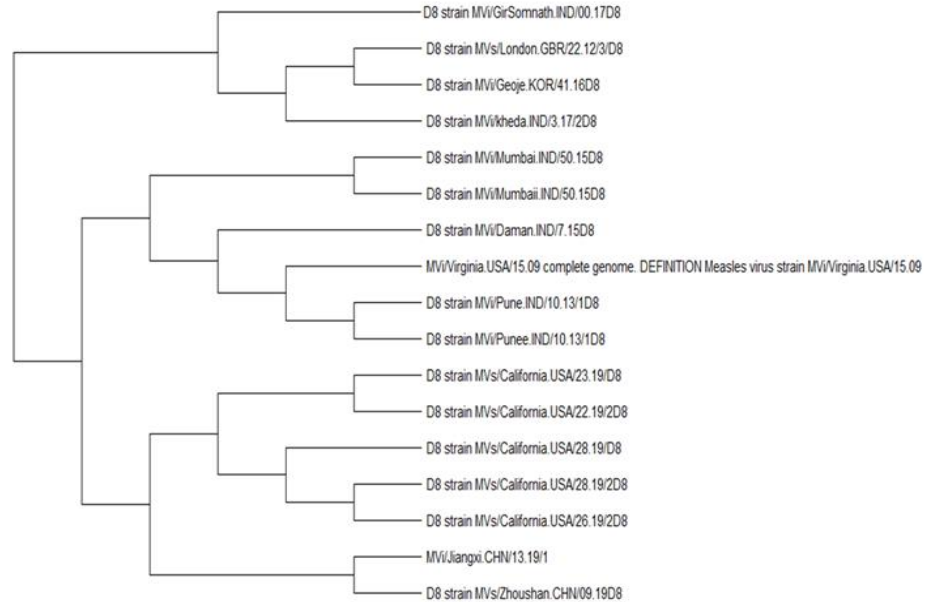


Рисунок 3 - Філогенетичні зв'язки штамів генотипу D8 вірусу кору.

**Примітка.** Історія еволюції була виведена з використанням методу Neighbor-Joining [20]. Показано оптимальне древо. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу виправлення Пуассона [31] і виражені в одиницях числа амінокислотних замінів на сайт. Цей аналіз включав 17 амінокислотних послідовностей. Усі неоднозначні позиції були видалені за кожної пари послідовностей (варіант попарного видалення). В остаточному наборі даних було лише 4989 позицій. Еволюційний аналіз проводився в MEGA X [21]

Якщо позначити вузли ідентифікаторами які утворюється шляхом конкатенації всіх ключів екземплярів споріднених груп та утворюють повний зчеплений ключ – ідентифікатор запису, отримаємо наступний вигляд древа (рисунок 4). Бачимо, що MVs D8GirSomnath є близькоспорідненим з MVs D8Kheda IND і утворює вузол 20, який і дає початок двом відгалуженням в вузлі 26, на 25 і 28, які в свою чергу дають початок великій генетичній різноманітності вузлів-нащадків з великою висотою вузла до крайових представників.

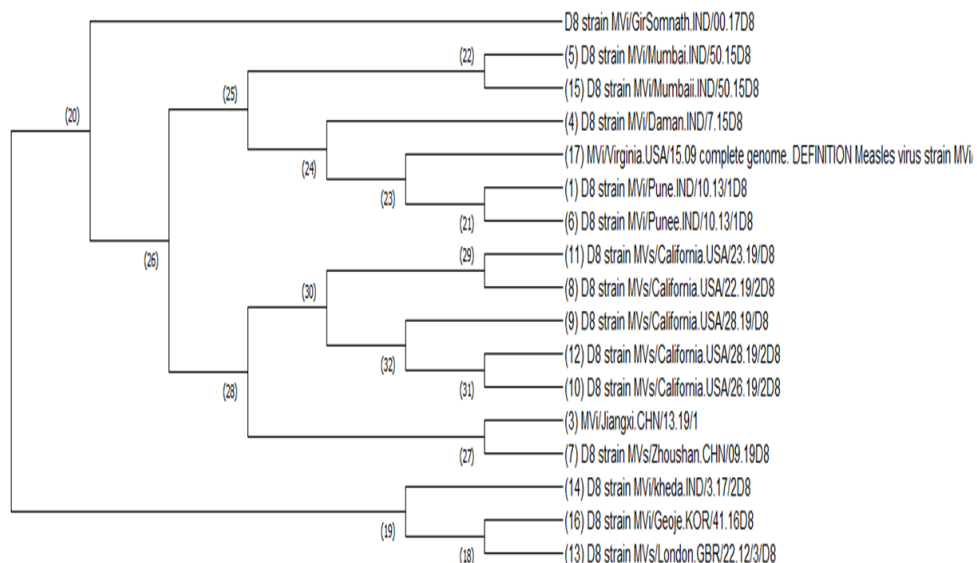
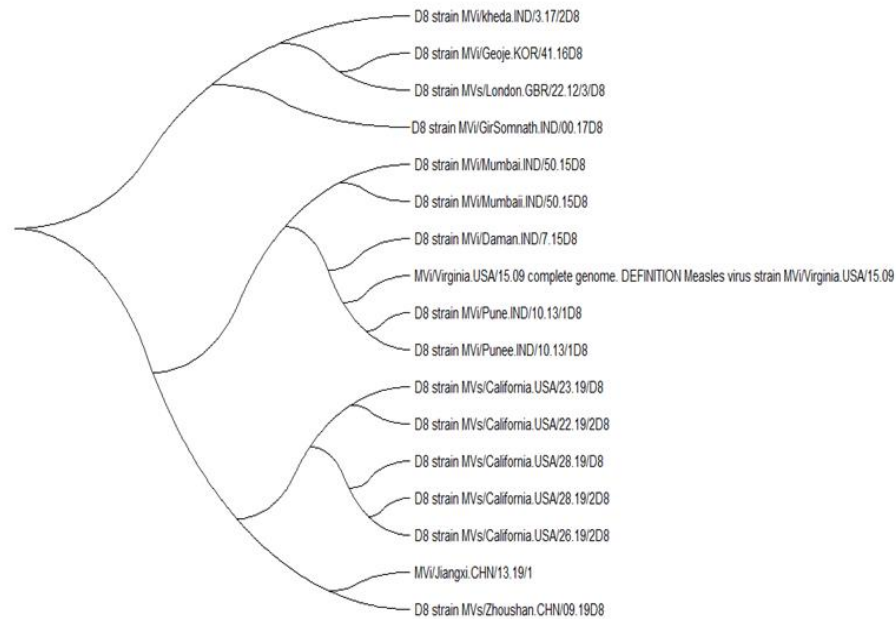


Рисунок 4 - Філогенетичні зв'язки штамів генотипу D8 вірусу кору з ідентифікаторними вузлами.

**Примітка.** Історія еволюції була виведена з використанням методу Neighbor-Joining [20]. Показано оптимальне дерево. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу виправлення Пуассона [31] і виражені в одиницях числа амінокислотних замінів на сайт. Цей аналіз включав 17 амінокислотних послідовностей. Усі неоднозначні позиції були видалені за кожної пари послідовностей (варіант попарного видалення). В остаточному наборі даних було лише 4989 позицій. Еволюційний аналіз проводився в MEGA X [21].

Для наочності представлення даних ми побудували генеалогічне древо, керуючись метою виявлення найближче споріднених генетичних одиниць. Як бачимо, з рисунку 5 саме штами MVs D8GirSomnath та MVs D8Kheda IND є родоначальниками великої гілки, що розгалужується на два великі вузли нащадків. При повторному моніторингу на Північно-східному регіоні України з великою вірогідністю, можливо виявити нащадків MVs D8GirSomnath, який є на даний час ендемічним для цього регіону.



**Рисунок 5 - Філогенетичні зв'язки штамів генотипу D8 вірусу кору.**

**Примітка.** Історія еволюції була виведена з використанням методу Neighbor-Joining [20]. Показано оптимальне дерево. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу виправлення Пуассона [31] і виражені в одиницях числа амінокислотних замінів на сайт. Цей аналіз включав 17 амінокислотних послідовностей. Усі неоднозначні позиції були видалені за кожної пари послідовностей (варіант попарного видалення). В остаточному наборі даних було лише 4989 позицій. Еволюційний аналіз проводився в MEGA X [21].

Отримані нами данні мають велике значення для вивчення шляхів передачі та удосконалення заходів епідеміологічного надзору над захворюваністю та потребують подальшого докладного вивчення [32, 33, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

### **Characterization of variability of epidemically active strains of measles virus circulating in the North-Eastern region of Ukraine.**

**Kalinichenko Svetlana Viktorovna, Melentieva Khristina Valentinovna, Toryanyk Inna Ivanovna, Antusheva Tatyana Ivanovna\**

**Introduction.** The incidence of measles, despite the availability of effective preventive measures, remains an urgent medical and social problem worldwide, which is included in the list of infections that in the long run can be reduced to isolated cases. Infectious morbidity of the population to some extent depends on the quality of preventive measures, among which specific prevention is the most successful, effective and cheap medical and preventive means. Genotyping of measles virus isolates circulating in a certain area is used to track the routes of measles virus transmission and to differentiate post-vaccination complications from cases of disease caused by infection with wild-type strains. **Material & methods.** WHO Molecular External Quality Assessment Program,

### **Висновок**

За отриманими нами та літературними даними, вірус кору, як і всі РНК вмістні віруси має високу мутагенність. Нами виявлено характерну ендемічність окремих штамів вірусу кору на Північно-східному регіоні України. Найросповсюдженішими штамми є Gir Somath D8, Cambridg генотипу D8 та агресивний Kabul генотипу B3. А також, судячи з аналізу генеалогічних дерев, можна припустити, що Edmonston-ZagrebB3, MVsB3CaliforniaUSA, MVsB3PadovaITA, MVsB3LondonGBR, генотипу B3 та штам D8Kheda IND генотипу D8 є ендемічними на Північно-східному регіоні України.



WHO Centralized Infectious Diseases Information System EUR, WHO Measles Surveillance Databases. Statistical data and reporting forms on the conducted epidemiological, virological and serological studies on measles infection in the Kharkiv region for 2017-2020, provided by the State Institution "Kharkiv regional medical center of the Ministry of Health of Ukraine". Neighbor-Joining clustering method for the creation of phylogenetic trees and the MADx 10 program. **Results & discussion.** To determine the epidemiologically important variants of MV sequences in the North-Eastern region of Ukraine, we summarized data from MeaNS databases on the predominant strains called "named strains" of genotypes, namely D8 and B3, analyzing their phylogeny (N-450 nucleotides). We analyzed the genetic relationships and evolutionary distances between closely related strains of genotypes B3 and D8. To do this, using the latest version of MADx, which allows you to compare data from servers around the world, we built family trees of phylogenetic sequences of closely related strains. Endemic in the North-Eastern region of Ukraine, genotype B3 was often imported to European countries. It is known that a large number of "named strains" are represented by this genotype. According to our data and literature, the measles virus, like all RNA-containing viruses, is highly mutagenic. We found a characteristic endemicity of certain strains of measles virus in the North-Eastern region of Ukraine. **Conclusion.** The most common strains are Gir Somath D8, Cambridge genotype D8 and aggressive Kabul genotype B3. Also, based on the analysis of genealogical trees, we can assume that Edmonston-ZagrebB3, MVsB3CaliforniaUSA, MVsB3PadovaITA, MVsB3LondonGBR genotype B3 and strain D8Kheda IND genotype D8 are endemic in Northeastern Ukraine. The data obtained by us are of great importance for studying the ways of transmission and improvement of measures of epidemiological surveillance of the disease and require further careful study.

**Keywords:** variability, strains, measles virus, North-Eastern region of Ukraine.

## References

1. Rota J.S., Heath J.L., Rota P.A. [et al.] Molecular epidemiology of measles virus: identification of pathways of transmission and implications for measles elimination // *J Infect Dis.* 1996. № 173. V.1. P. 32–37.
2. Tamin A., Rota P. A., Wang Z. [et al.] Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles // *The Journal of Infectious Diseases.* 1994. V. 170. № 4. P. 795–801. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.4.795>
3. Necula G., Lazar M., Stanescu A. [et al.] Transmission and molecular characterisation of wild measles virus in Romania, 2008 to 2012 // *Euro Surveill.* 2013. № 18. P. 20658.
4. Santibanez S., Heider A., Gerike E. [et al.] Genotyping of measles virus isolates from central Europe and Russia // *J Med Virol.* 1999. № 58. P. 313–320.
5. Rima B.K., Earle JAP, Yeo R.P. [et al.] Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes. // *J Gen Virol.* 1995. № 76. P.1173–1180.
6. Jin L., Brown D.W., Ramsay M.E. The diversity of measles virus in the United Kingdom 1992–1995 // *J. Gen Virol.* 1997. № 78. P. 1287–1294.
7. Hanses F., van Binnendijk R., Ammerlaan W. [et al.] Genetic variability of measles virus circulating in the Benelux // *Arch Virol.* 2000. № 145. P. 541–551.
8. Torner N., Anton A., Barrabeig I. [et al.] Epidemiology of two large measles virus outbreaks in Catalonia: what a difference the month of administration of the first dose of vaccine makes // *Hum Vaccin Immunother.* 2013. № 9. P. 675–680.
9. Santibanez S., Tischer A., Heider A. [et al.] Rapid replacement of endemic measles virus genotypes // *J Gen Virol.* 2002. № 83. P. 2699–2708.
10. Kremer J.R., Brown K.E., Jin L. [et al.] High genetic diversity of measles virus, World Health Organization European Region, 2005–2006. // *Emerg Infect Dis.* 2008. № 14. P. 107–114.
11. Shulga S.V., Rota P.A., Kremer J.R. [et al.] Genetic variability of wild-type measles viruses, circulating in the Russian Federation during the implementation of the National Measles Elimination Program, 2003–2007 // *Clin Microbiol Infect.* 2009. № 15. P. 528–537.
12. Wairagkar N., Chowdhury D., Vaidya S. [et al.] Molecular epidemiology of measles in India, 2005–2010 // *J Infect Dis.* 2011. № 204. P. 403–413.
13. Santibanez S., Hübschen J.M., Ben Mamou M.C. [et al.] Molecular surveillance of measles and rubella in the WHO European Region: new challenges in the elimination phase // *Clinical Microbiology and Infection.* 2017. № 23. P. 516 – 523.
14. Kumar S., Stecher G., Tamura K. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol Biol Evol.* 2016. № 33. P. 1870–1874.
15. Tamura K., Nei M., and Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 2004. № 101. P. 11030-11035.
16. Salimović-Bešić I., Šeremet M., Hübschen J.M. [et al.] Epidemiologic and laboratory surveillance of the measles outbreak in the Federation of Bosnia and Herzegovina, February 2014–April 2015 // *Clin Microbiol Infect.* 2016. № 22. P. 563–567.
17. Kopel E., Amitai Z., Savion M. [et al.] Ongoing African measles virus genotype outbreak in Tel Aviv district since April, Israel, 2012. // *Euro Surveill* 2012. № 17. P. 20272. URL: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20272>.
18. Torner N., Anton A., Barrabeig I. [et al.] Epidemiology of two large measles virus outbreaks in Catalonia: what a difference the month of administration of the first dose of vaccine makes // *Hum Vaccin Immunother.* 2013. № 9. P. 675–680.
19. Rota J., Lowe L., Rota P. [et al.] Identical genotype B3 sequences from measles patients in 4 countries, 2005 // *Emerg Infect Dis.* 2006. № 12. P. 1779–1781.
20. Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987. № 4. P. 406-425.
21. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

- across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 2018. № 35. P. 1547-1549.
22. Rota J.S., Rota P.A., Redd S.B. [et al.] Genetic analysis of measles viruses isolated in the United States, 1995–1996 // *J Infect Dis.* 1998. № 177. P. 204–208.
23. Orenstein W.A, Papania M.J., Wharton M.E. Measles elimination in the United States // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 189. P. 1–3.
24. Rota P.A., Featherstone D.A., Bellini W.J. Measles. Pathogenesis and control Chapter 7, *Molecular Epidemiology of Measles Virus // Curr Top Microbiol Immunol.* 2009. № 330. P. 129 – 150.
25. Bankamp B. Genetic Characterization of Measles Vaccine Strains/B. Bankamp, M. Takeda, Y. Zhang et al. // *J Infect Dis.* 2011. № 204 (suppl 1). P. 533 - 548.
26. (Santé publique France. Epidemiological update on measles, 19 September 2018. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-preventionvaccinale/Rougeole/Points-d-actualites/Bulletin-epidemiologique-rougeole.-Donnees-de-surveillance-au-19-septembre-2018>).
27. World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe. Eliminating measles and rubella: Framework for the verification process in the WHO European Region. Copenhagen // WHO Regional Office for Europe. 2014.
28. Mulders M. N., Rota P. A., Icenogle J. P. [et al.] Global Measles and Rubella Laboratory Network support for elimination goals, 2010–2015 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016. № 65. P. 438–442.
29. Wairagkar N., Rota P.A., Liffick S. [et al.] Characterization of measles sequences from Pune, India // *J Med Virol.* 2002. № 68. P. 611–614.
30. Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987. № 4. P. 406-425.
31. Zuckerkandl E. and Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* V. Bryson and H. J. Vogel, 1965. P. 97-166. Academic Press, Нью-Йорк.
32. Kreis S., Whistler T. Rapid identification of measles virus strains by the heteroduplex mobility assay // *Virus Research.* 1997. V. 47. P. 197-203.
33. Schrag S. J., Rota P.A., Bellini W. J. Spontaneous Mutation Rate of Measles Virus: Direct Estimation Based on Mutations Conferring Monoclonal Antibody Resistance // *Journal of virology* Jan. 1999. V. 73, Is 1., p. 51–54.
34. Kalinichenko SV Genetic features of epidemically relevant strains of measles in the Kharkiv region / S. V. Kalinichenko, NV Zvereva, Kh. V. Melentyeva, II Toryanyk, TI Antusheva, LO Popova // *Microbiological readings in memory of Professor Yuri Leonidovich Volyansky: materials of the scientific-practical conference (February 12, 2020, Kharkiv).* - P. 137.