



ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России

Особенности эволюции современных вирусов гриппа по результатам расширенного генетического анализа с использованием NGS-технологии

А. Б. Комиссаров

Рабочее совещание по вопросам эпидемиологического надзора за гриппом и ОРВИ со специалистами
территориальных органов и подведомственных организаций Роспотребнадзора

22-23 октября 2019 г.
г. Санкт-Петербург

Технологии секвенирования: сравнение производительности



ABI GA 3130

3 недели,
1 полный геном,
40 тыс. п.о.
Покрытие < 4

```
ATGGACTCCA ACACCATGTC AAGCTTTCAG GTAGACTGTT TTCTTTGGCA
TATTCGCAAG CGATTTGCAG ACAATGGATT GGGTGATGCC CCATTCCTTG
ATCGGCTACG CCGAGATCAA AAGTCCTTAA AAGGAAGAGG CAACACCCTT
GGCCTCGACA TCAAAACAGC CACTCTTGTT GGGAAACAAA TCGTGGAATG
GATTTTGAAG GAGGAATCCA GCGAGACACT TAGAATGACA ATTGCATCTG
TACCTACTTC GCGTTACATT TCTGACATGA CCCTCGAGGA AATGTCACGA
```

Последовательность



Образец



Illumina MiSeq

2 недели,
До 192 полных геномов,
~8-15 млрд. п.о.
Покрытие > 100 (до 10 000)



Цели методов NGS в надзоре за гриппом

- Увеличение производительности полногеномного секвенирования
- Снижение времени «от образца до генома»
- Унификация протоколов секвенирования для разных вирусов гриппа

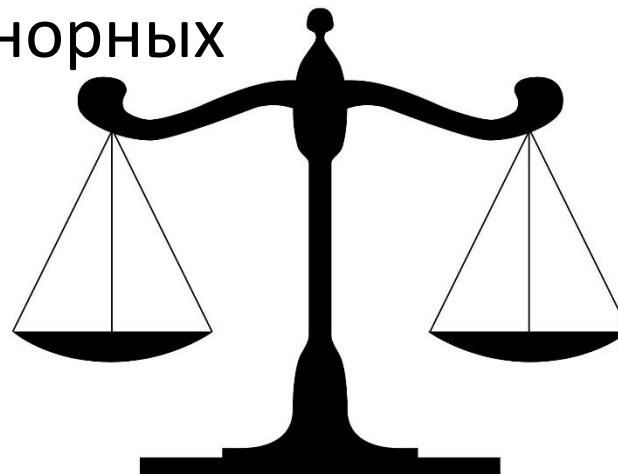
NGS и секвенирование методом Сэнгера: за и против

«ЗА»

- Низкая цена за геном (около **3 500 - 7 000 руб** за геном)
- Высокая производительность
- Получение дополнительных данных (детекция минорных вариантов)

«ПРОТИВ»

- Высокая стоимость запуска (около **800 000 руб** за запуск)
- Запуск «все или ничего»
- Сложность анализа

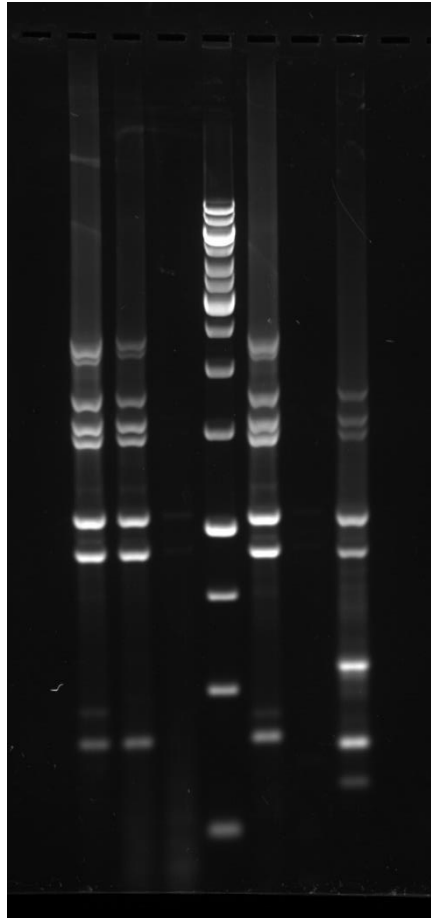


Амплификация полного генома вируса гриппа

Одноступенчатая ОТ-ПЦР:

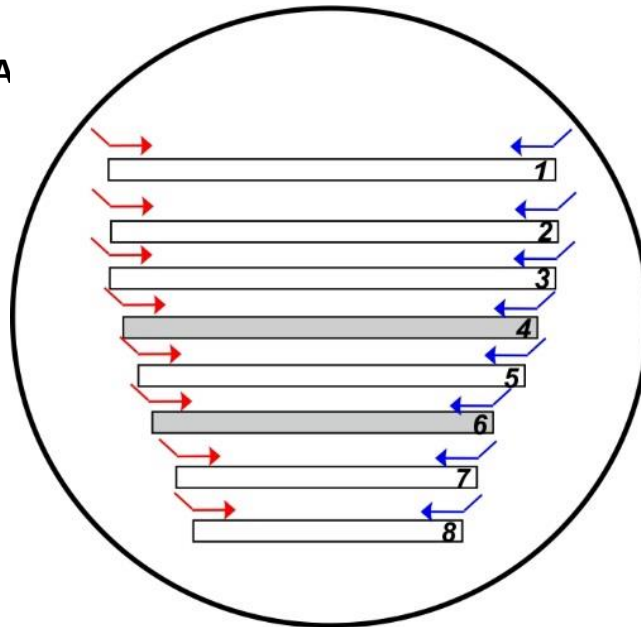
Zhou et al. 2009 с изменениями (для вирусов гриппа А)

Zhou et al., 2014 с изменениями (для вирусов гриппа В)



← PB2, PB1, PA
← HA
← NP
← NA

← M
← NS



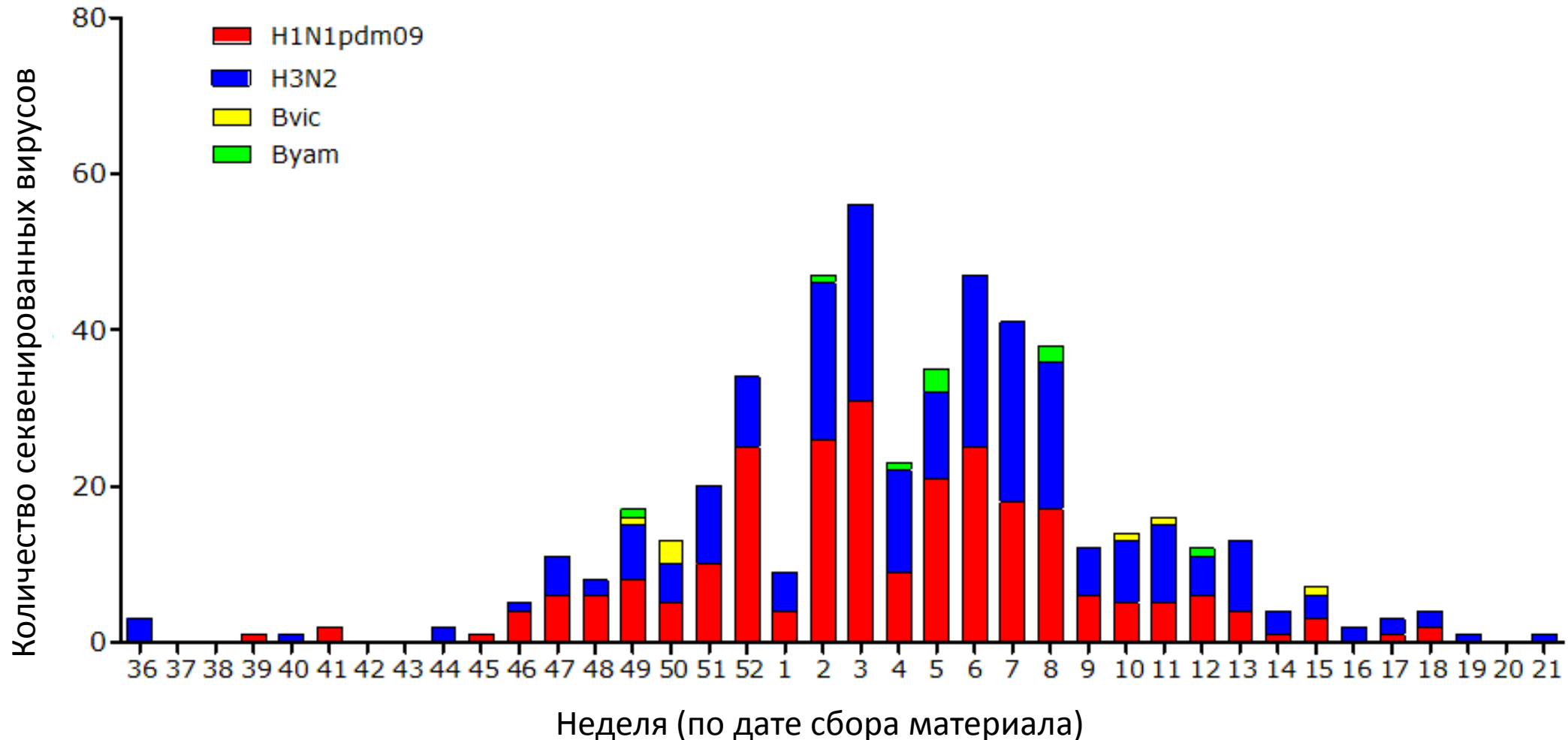
Успешность сильно зависит от типа образца

Вирусный изолят: >94%

Назофарингеальный смыв: 60%

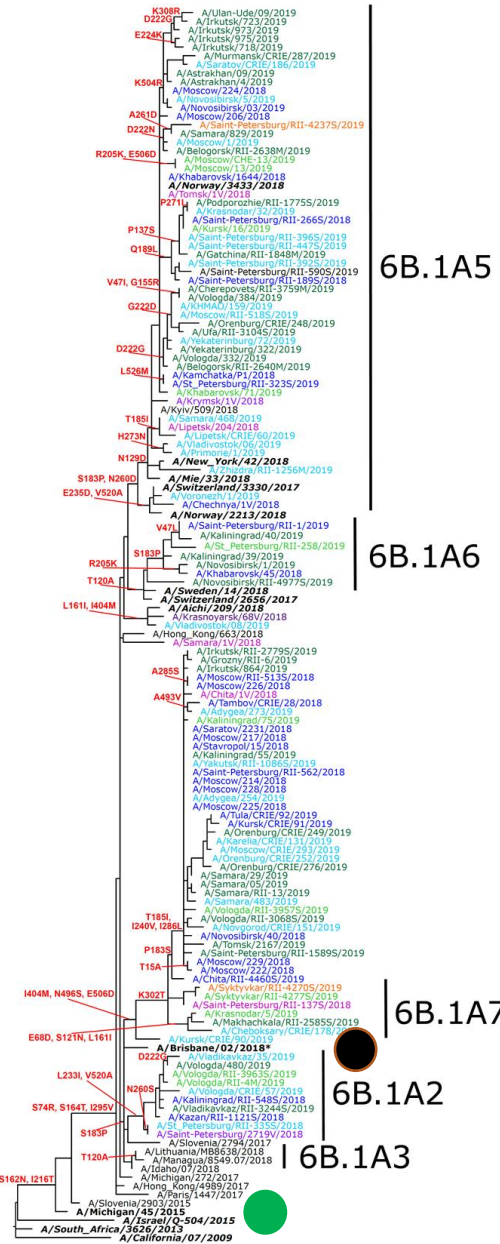
Критерий отбора первичных образцов:
 $C_t < 20-25$ в ПЦР в реальном времени

Распределение секвенированных вирусов по неделям эпидсезона 2018-2019

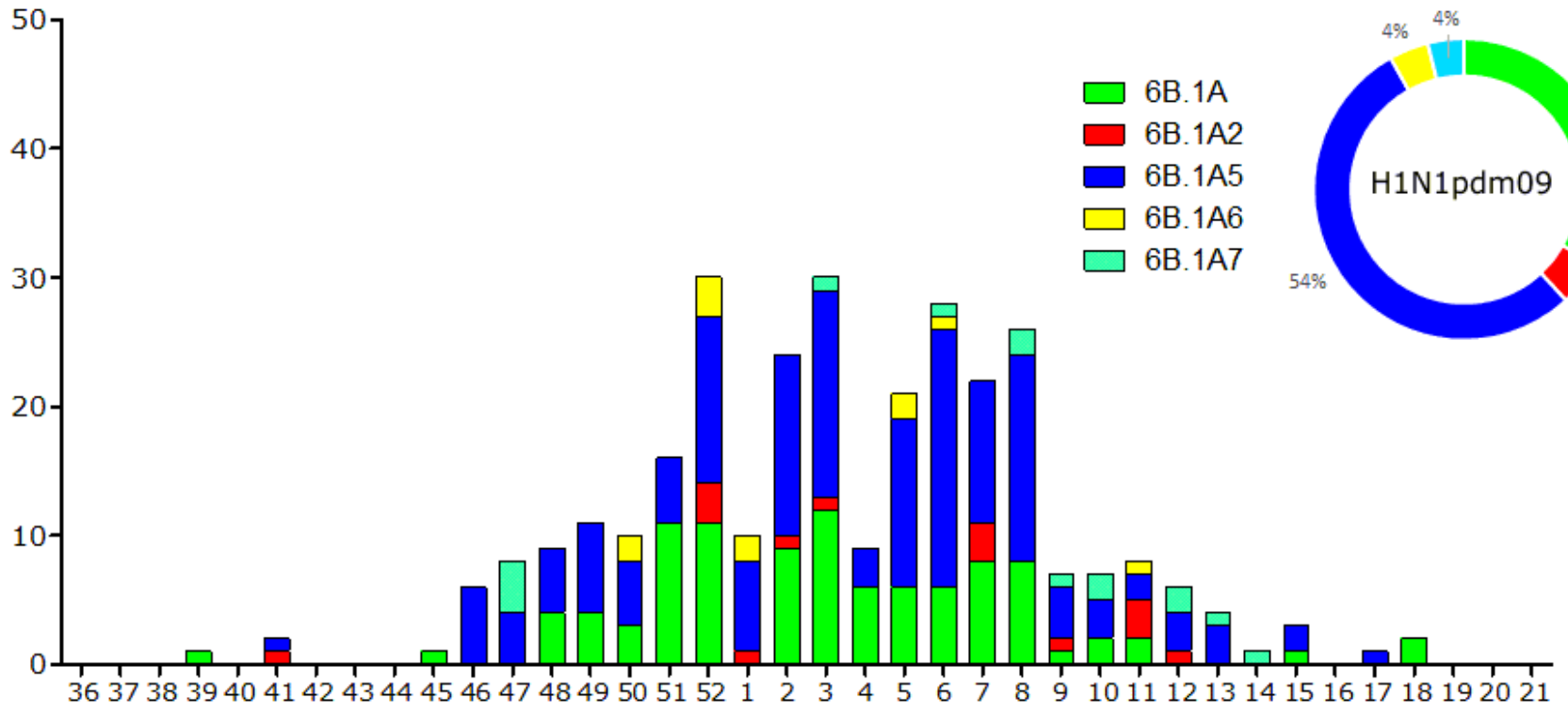


H1N1pdm09

- A/Michigan/45/2015 – старый вакцинный штамм (СП 2018-2019)
- A/Brisbane/02/2018 – новый вакцинный штамм (СП 2019-2020, ЮП 2020)

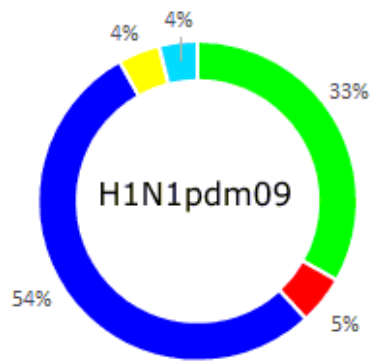


Количество секвенированных вирусов



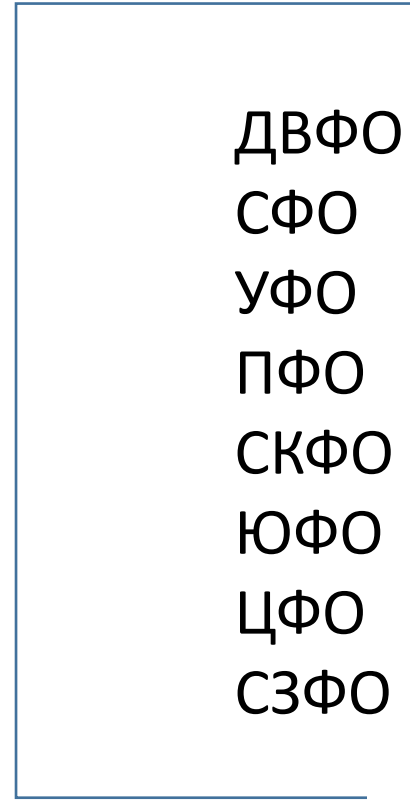
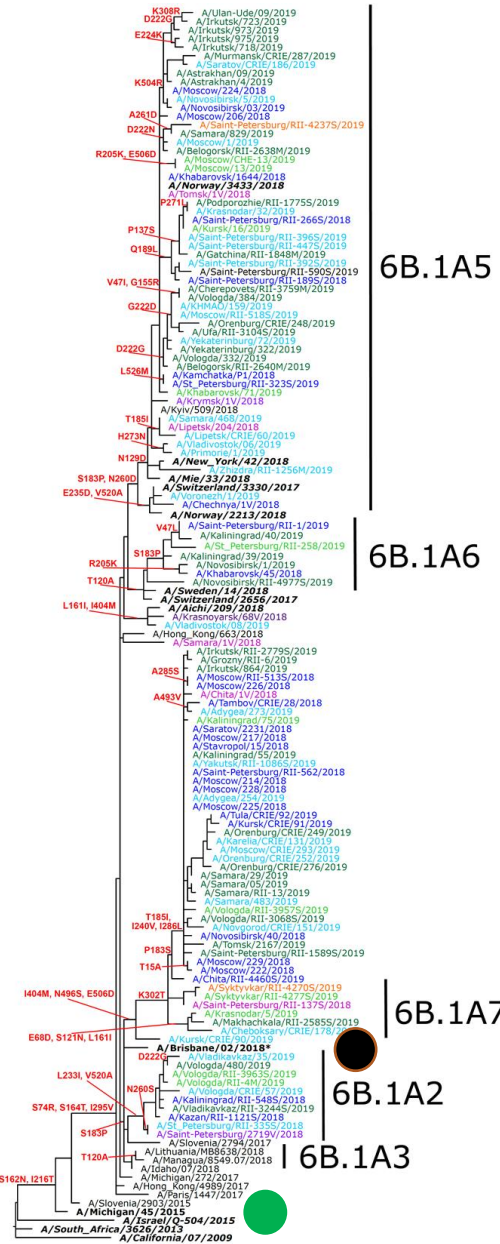
Неделя (по дате сбора материала)

- 6B.1A
- 6B.1A2
- 6B.1A5
- 6B.1A6
- 6B.1A7

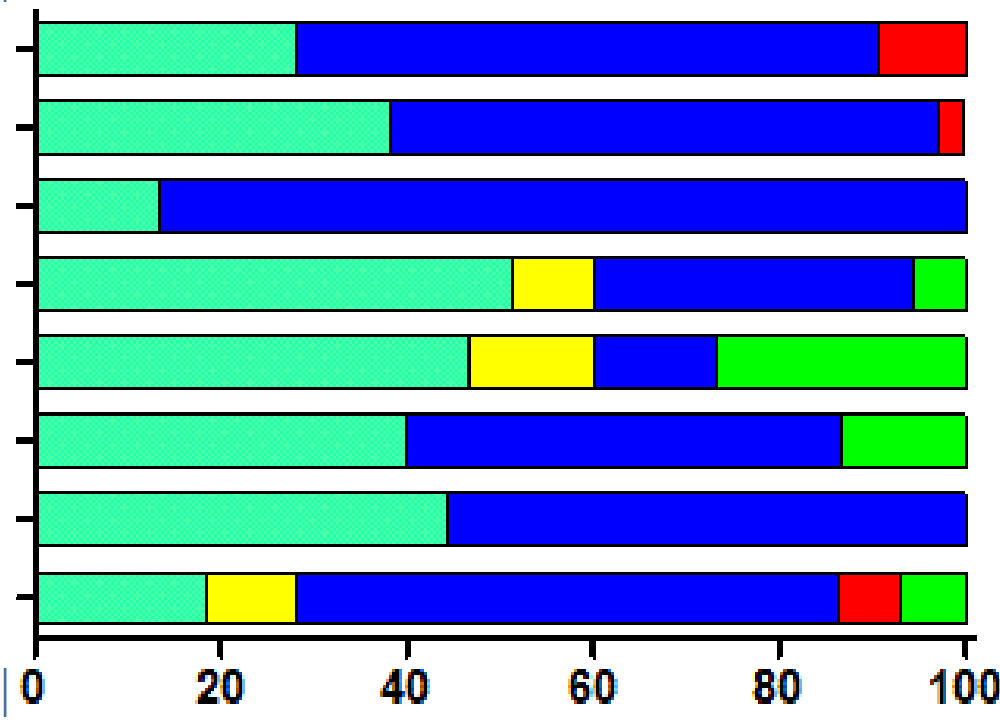


H1N1pdm09

- A/Michigan/45/2015 – старый вакцинный штамм
- A/Brisbane/02/2018 – новый вакцинный штамм (СП 2019-2020, ЮП 2020)



ДВФО
СФО
УФО
ПФО
СКФО
ЮФО
ЦФО
СЗФО

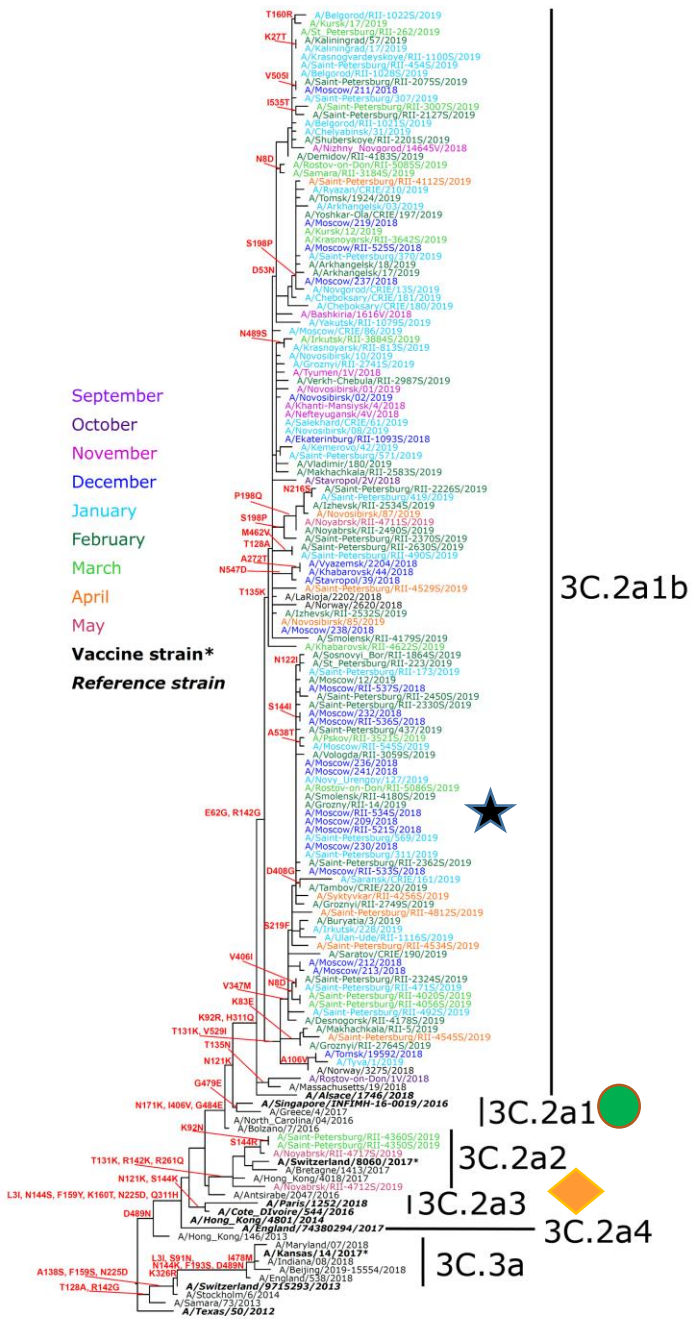


% секвенированных вирусов гриппа

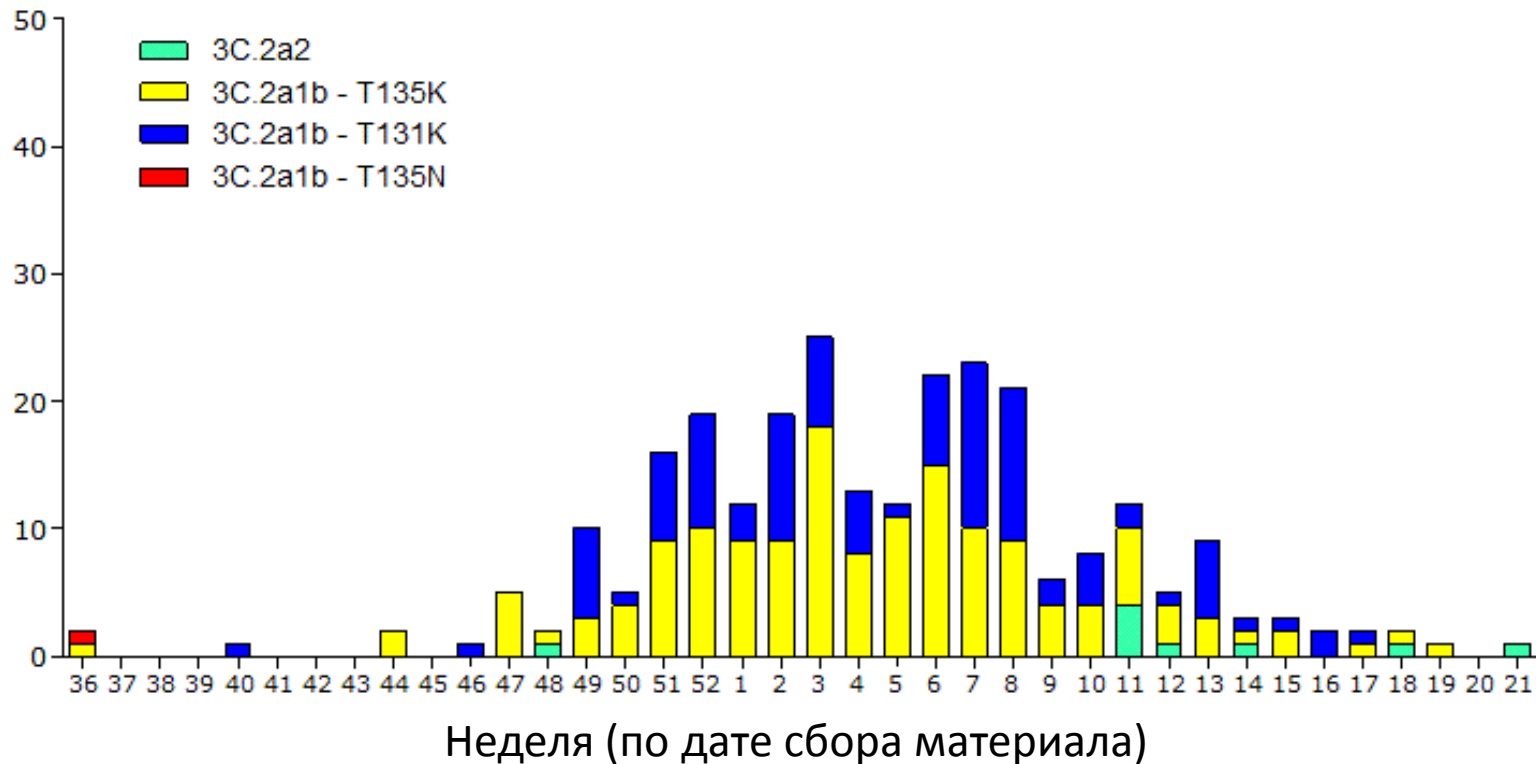
- 6B.1A
- 6B.1A2
- 6B.1A5
- 6B.1A6
- 6B.1A7

H3N2

- A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 – старый вакцинный штамм (3C.2a1)
- ◆ A/Kansas/14/2017 – новый вакцинный штамм СП (3C.3a)
- ★ A/South Australia/34/2019 – новый вакцинный штамм ЮП (3C.2a1b)

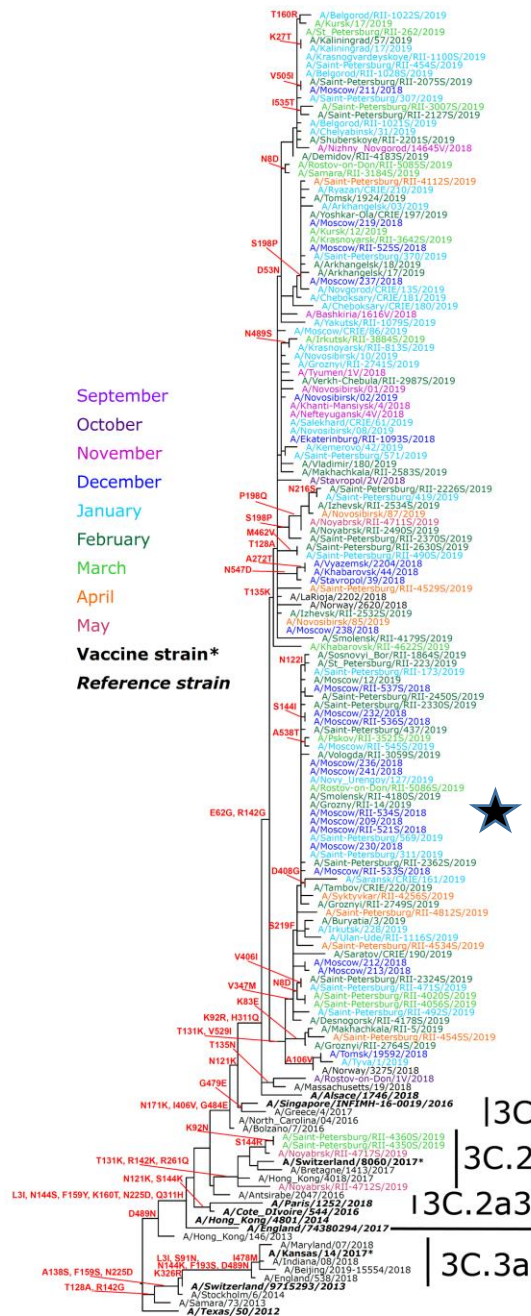


Количество секвенированных вирусов



H3N2

- A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 – старый вакцинный штамм (3C.2a1)
- ◆ A/Kansas/14/2017 – новый вакцинный штамм СП (3C.3a)
- ★ A/South Australia/34/2019 – новый вакцинный штамм ЮП (3C.2a1b)



3C.2a1b



3C.2a1

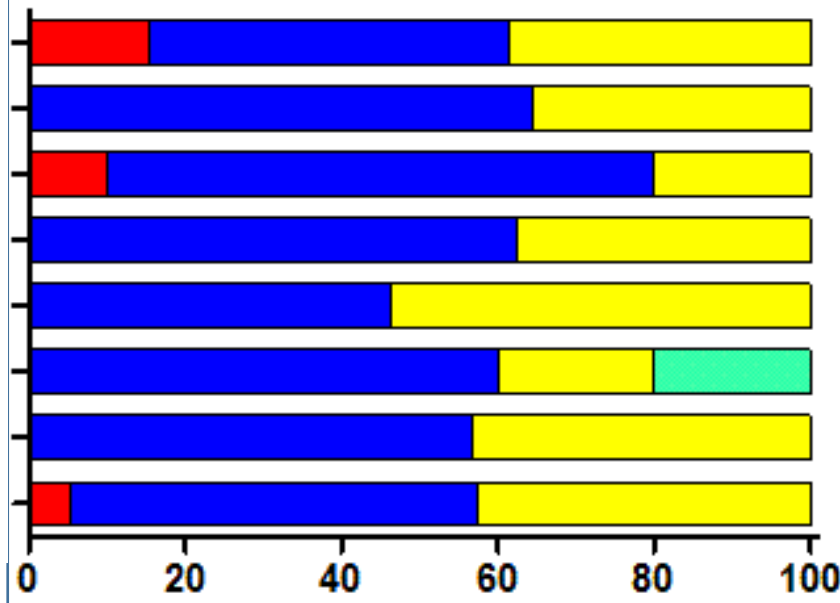
3C.2a2

3C.2a3

3C.2a4

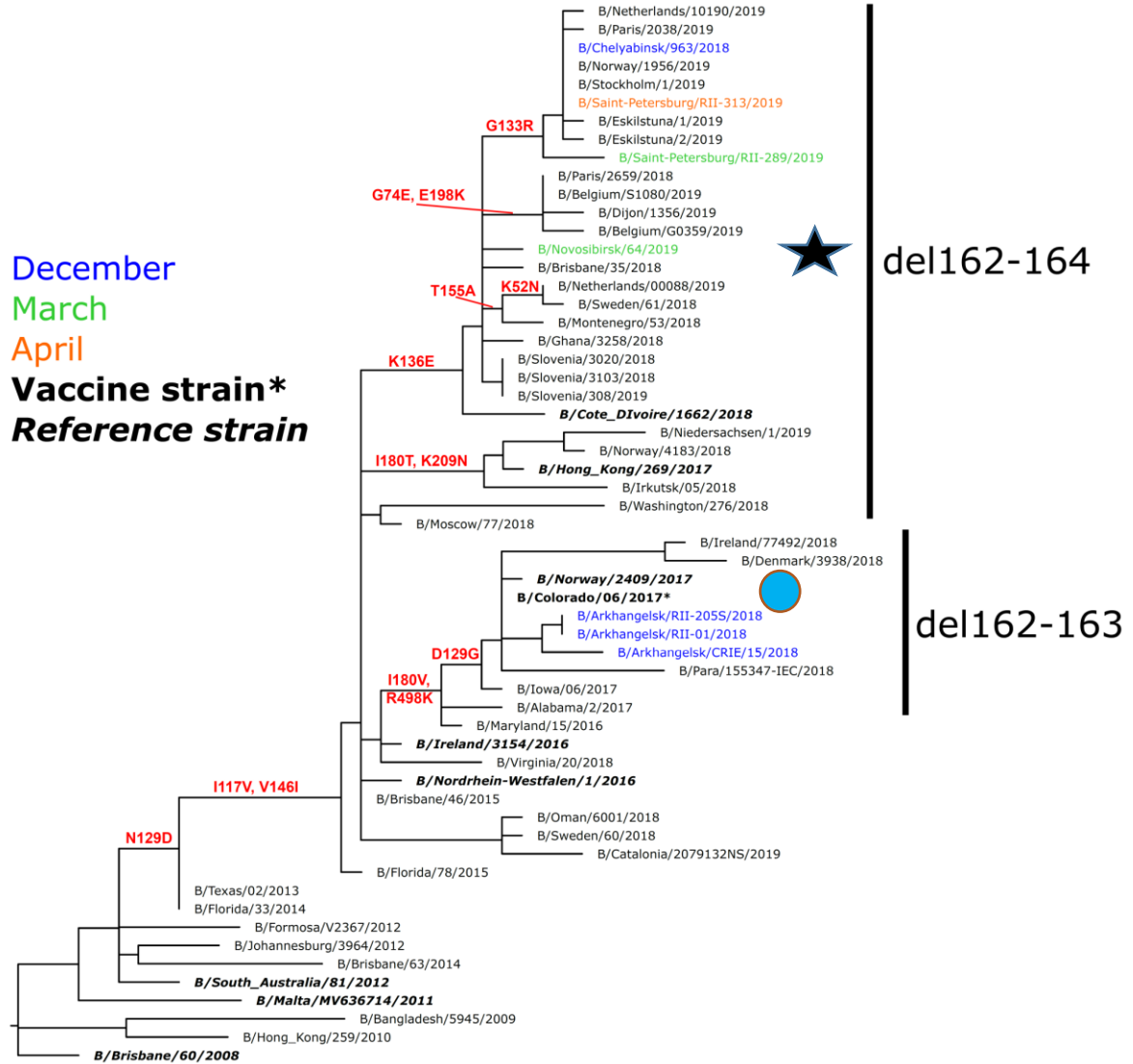
3C.3a

ДВФО
СФО
УФО
ПФО
СКФО
ЮФО
ЦФО
СЗФО



% секвенированных вирусов гриппа

Вирусы гриппа В(Victoria)



December
 March
 April
Vaccine strain*
Reference strain

● Вакцинный штамм B/Colorado/06/2017 (del162-163)

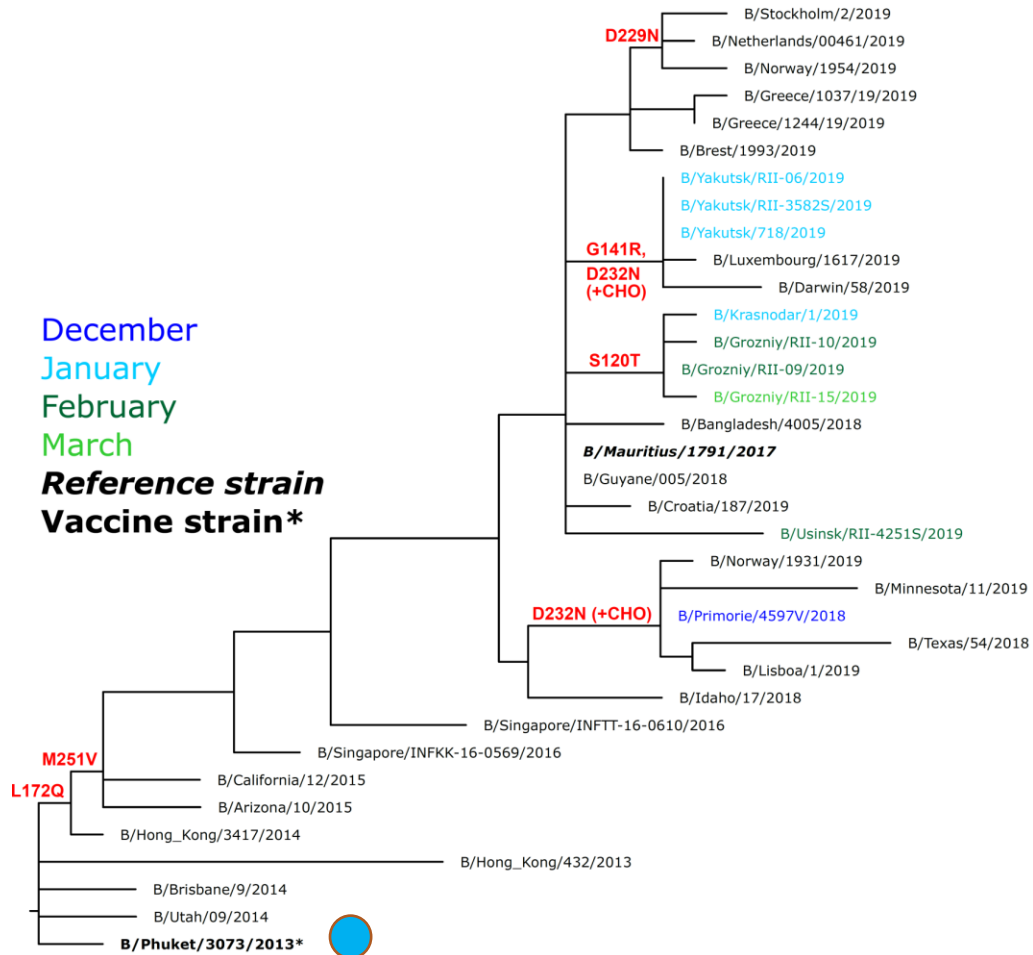
★ Новый вакцинный штамм ЮП
 B/Washington/02/2019 (del162-164)

del162-164

del162-163

1A

Вирусы гриппа В(Yamagata)



7.0E-4

 Вакцинный штамм B/Phuket/3073/2013

3

Значение молекулярно-генетического анализа

• Научное

Понимание механизмов эволюции вирусов гриппа

Филогеография и филодинамика вирусов гриппа

Исследование закономерностей реассортации сегментов генома вируса гриппа

Исследование коэволюции различных положений в геноме вирусов гриппа

Детерминанты патогенности вирусов

Интересно, но далеко от практики

• Практическое

Выявление мутаций устойчивости к противовирусным препаратам

Определение соответствия циркулирующих вирусов вакцинным штаммам

Вклад в выбор вакцинных штаммов на следующий эпидемический сезон

Чем больше данных о вирусах, тем больше вероятность, что вакцинные штаммы будут отражать циркулирующие в следующем сезоне России вирусы гриппа

Непосредственное влияние на благополучие населения

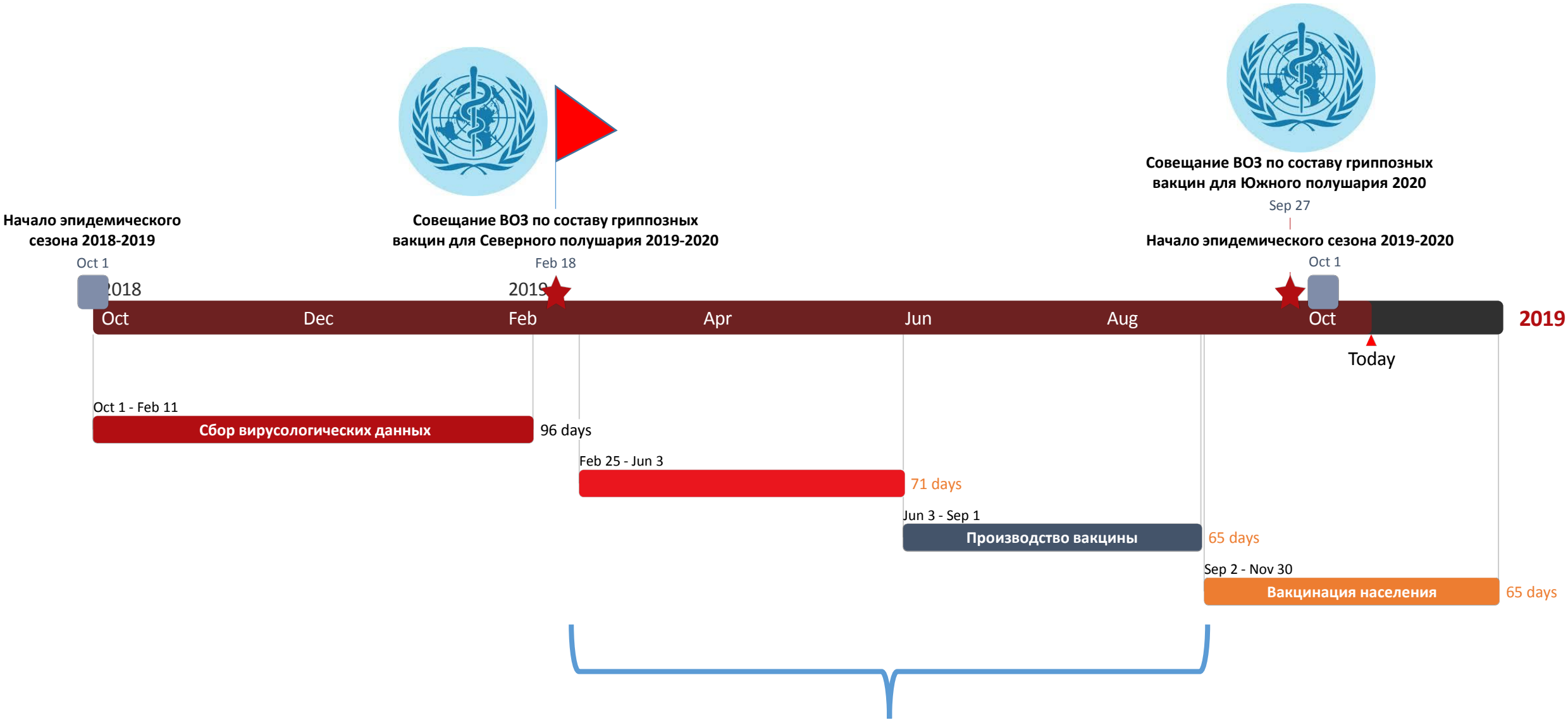


Репрезентативность

- Географическая репрезентативность
 - Сколько регионов нужно покрыть генетическим анализом?
 - Сколько вирусов из одного региона нужно секвенировать?
- Временная репрезентативность
 - Сколько вирусов в начале, середине и конце эпидемии нужно секвенировать?

**Практическая ценность вирусологических данных начала эпидемии
ВЫШЕ
ценности данных конца эпидемии**

Выбор вакцинных штаммов и производство вакцин



Производство вакцины – около 6 мес

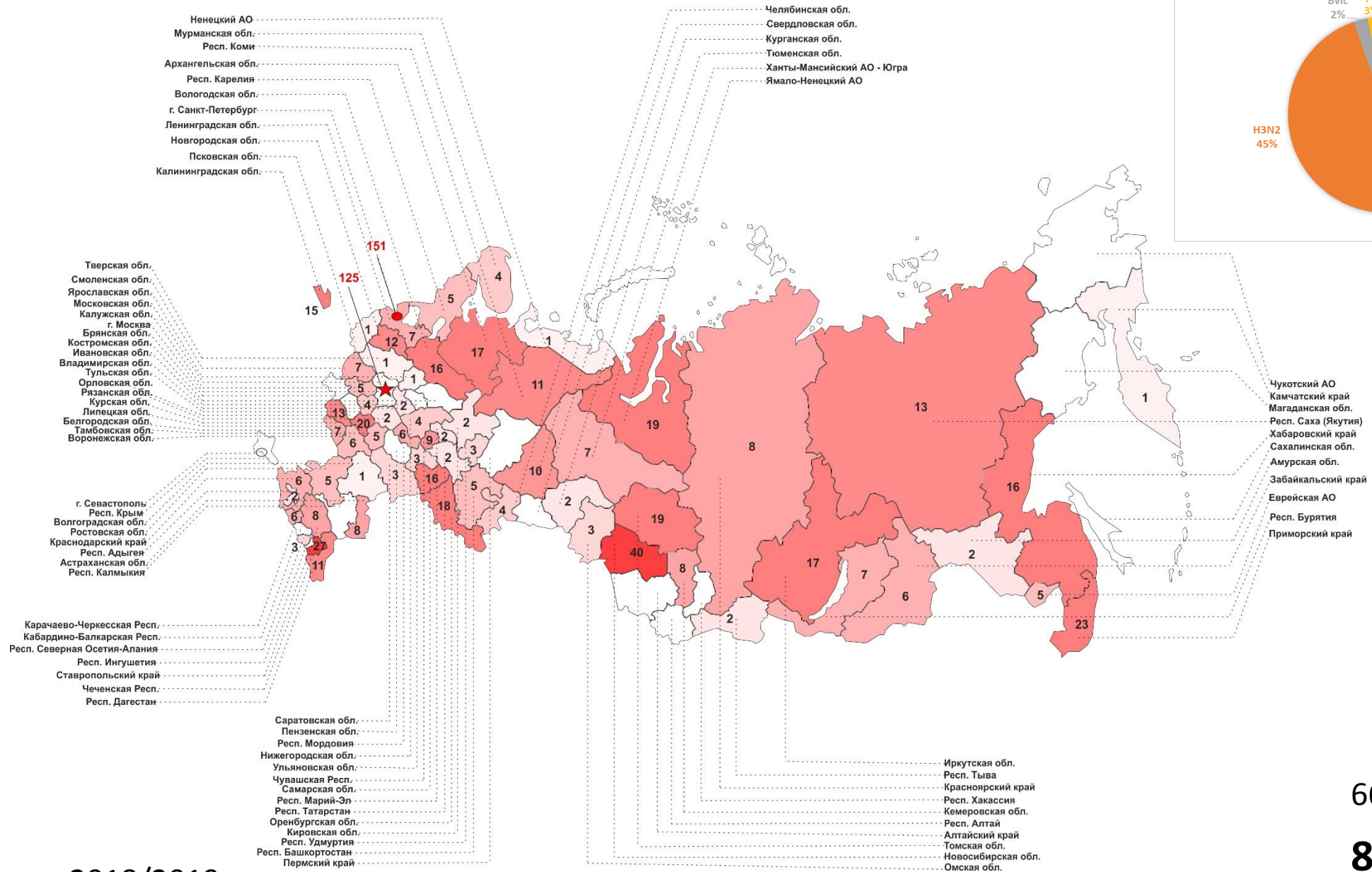
Основные организации, выполняющие молекулярно-генетический анализ вирусов гриппа из России

Эпидемический сезон 2018-2019

| Организация | Всего секвенировано | Секвенировано до VCM* | Регионы | Регионы до VCM |
|---|---------------------|-----------------------|---------|----------------|
| ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России (НЦГ ВОЗ Санкт-Петербург) | 320 | 106 | 41 | 14 |
| Сотрудничающий центр ВОЗ в Атланте (США) | 125 | 0 | 22 | 0 |
| ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора России | 115 | 47 | 40 | 28 |
| ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора России | 102 | 1 | 27 | 1 |
| Сотрудничающий центр ВОЗ в Лондоне (Великобритания) | 99 | 5 | 29 | 3 |
| ФНИЦЭМ им Н. Ф. Гамалеи Минздрава России (НЦГ ВОЗ Москва) | 33 | 10 | 10 | 2 |

*VCM – Совещание ВОЗ по штаммовому составу гриппозных вакцин для Северного полушария (сезон 2019-2020)

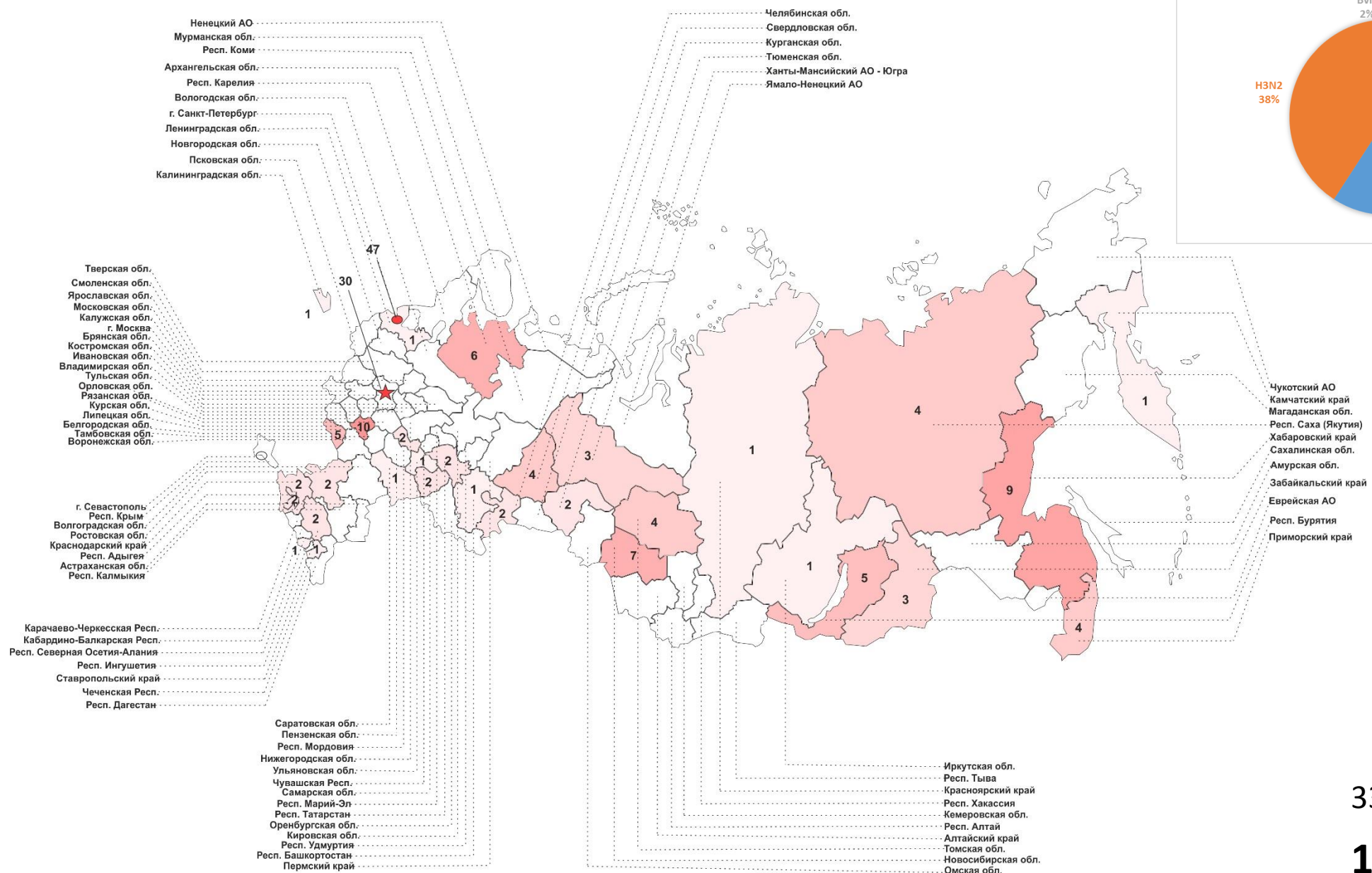
Географическое распределение секвенированных образцов



66 регионов

802 вируса

Географическое распределение секвенированных образцов







11 февраля 2019 г. (1 нед. до совещания по составу гриппозных вакцин)

33 региона

169 вирусов

Количество секвенированных вирусов в разных странах (по данным TESSy, FluNET, GISAID)

| | Всего за сезон 2018-2019 | До VCM (до 11.02.2019) | Доля от грипп+ | Секвенировано до вакцинного совещания |
|--|-----------------------------|---------------------------|-------------------|---|
|  США | 8248 | 1081 | 19,90% | 13,11% |
| Европа (без России) | 7797 | 3035 | 3,72% | 38,93% |
|  Россия | 802 | 169 | 4,39% | 21,07% |
|  Испания | 1569 | 372 | 7,34% | 23,71% |
|  Нидерланды | 770 | 144 | 15,78% | 18,70% |

FluNet



*VCM – Совещание ВОЗ по штаммовому составу гриппозных вакцин для Северного полушария (сезон 2019-2020)

Выводы

- Технология NGS позволяет увеличить производительность надзора за гриппом
- Вклад страны в принятие решения ВОЗ о штаммовом составе гриппозных вакцин на следующий эпидемический сезон зависит от полноты и своевременности вирусологического надзора за гриппом (ПЦР, отправок биоматериалов, секвенирования)
- Только за счет организационных мер можно было увеличить вклад России в подготовку решения о составе гриппозных вакцин на **85%** в эпидсезоне 2018-2019

Спасибо за внимание!

