

С. Б. Яцьшина, Г. А. Шипулин, Т. С. Астахова, С. И. Браславская, Т. Ю. Кондратьева, И. Л. Обухов, А. Н. Панин, В. В. Малеев, В. И. Покровский

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ПТИЧЬЕГО ГРИППА В ИЮЛЕ—ДЕКАБРЕ 2005 Г.

ФГУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, ФГУ Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ВГНКИ), Москва

*Проведен молекулярно-генетический анализ вирусов гриппа А/Н5N1, обнаруженных в материале от павших диких и домашних птиц в ряде регионов России и Автономной Республики Крым за период июль — декабрь 2005 г. с целью определения их генетического разнообразия с учетом патогенности, эпидемической опасности и резистентности к противовирусным препаратам. Зарегистрирован ряд молекулярных маркеров, свидетельствующих о высокой патогенности вируса для птиц отряда куриных и млекопитающих, и не обнаружены мутации гемагглютинаина, облегчающие инфицирование людей. Показано, что циркулировавшие в данной эпизоотии варианты вируса гриппа А/Н5N1 чувствительны к ремантадину. В материале от диких лебедей обнаружен вариант вируса, имеющий мутацию резистентности к тамифлю.*

Ключевые слова: вирус птичьего гриппа А/Н5N1, филогенетический анализ, чувствительность к ремантадину, резистентность к тамифлю.

*Molecular genetic analysis was made of influenza A/H5N1 viruses detected in the material from dead wild birds and domestic poultry in some regions of Russia and in the autonomous republic of Crimea in the July–December of 2005 in order to determine their genetic variety, by taking into account the pathogenicity, epidemic danger, and resistance to antiviral agents. A number of molecular markers suggesting the high pathogenicity of a virus to gallinaceous (Galliformes) birds and mammals were recorded and hemagglutinin mutations favoring human infection were not found. The influenza A/H5N1 virus variants circulating in this epizooty were shown to be sensitive to rimantadine. The virus variant having tamiflu resistance mutation was detected in the material from hoopers.*

Key words: avian influenza A/H5N1 virus, phylogenetic analysis, rimantadine sensitivity, tamiflu resistance.

В июле 2005 г. впервые на территории России была зарегистрирована крупная эпизоотия среди дикой и домашней птицы, вызванная вирусом гриппа А/Н5N1, которая быстро распространилась из Сибири на юго-запад страны и на сопредельные государства. Несмотря на то что на территории России случаев заболевания людей гриппом А/Н5N1 не зарегистрировано, недавние события в Турции в 2005 г. и Азербайджане в 2006 г. свидетельствуют об опасности данного вируса для людей [35]. Российским ученым довольно быстро удалось идентифицировать этиологический агент эпизоотии, локализовать место его возникновения и определить его основные характеристики во время исследования павшей птицы из Новосибирской области [1, 3, 6, 7]. Российский вариант вируса наиболее близок выделенному от диких водоплавающих птиц, павших при эпизоотии в мае — августе 2005 г. в китайской провинции Qinghaihu на озере Цинхай. Установлено, что данный вариант вируса содержал несколько молекулярных маркеров, характеризующих его высокую патогенность для домашних птиц, а также видоспецифичный для птиц участок связывания гемагглютинаина с сиаловыми рецепторами. Однако до сих пор оставались неясными вопросы генетического разнообразия в популяции вирусов гриппа А/Н5N1, распространившейся по территории России. Требовалась более детальная характеристика изолятов, обнаруженных в разных регионах страны и ближнего зарубежья, чтобы ответить на вопрос, существуют ли в этой популяции различающиеся по степени патогенности для людей и чувствительности к проти-

вовирусным препаратам генетические варианты вируса.

Целью данной работы явилась оценка патогенности, эпидемической опасности и резистентности к противовирусным препаратам вирусов гриппа А/Н5N1, обнаруженных в материале от павших домашних птиц в ряде регионов России и Автономной Республики (АР) Крым, а также в материале павших диких лебедей в дельте реки Волги за период июль — декабрь 2005 г., с помощью молекулярно-генетического анализа.

### Материалы и методы

Использован материал от павших домашних птиц в селе Суздалька Доволенского района Новосибирской области (2 образца), селе Яндовка Ефремовского района Тульской области (2 образца) и селе Черноземельное Советского района АР Крым (2 образца), а также материал от павших диких лебедей в дельте реки Волги в районе Астраханской области (1 образец). Вирус гриппа А/Н5N1 в этих образцах был выявлен с помощью ПЦР с использованием тест-системы "АмплиСенс Influenza virus H5" (ФГУН ЦНИИЭ). Экстракцию РНК и реакцию обратной транскрипции проводили непосредственно из биологического материала — мозга павших птиц с использованием наборов реагентов "Рибо-сорб" и "Реверта-Л" (ФГУН ЦНИИЭ). Для секвенирования протяженных участков 4, 6, 7 и 8-го сегментов вируса гриппа Н5N1 были выбраны праймеры, образующие в процессе амплификации набор перекрывающихся фрагментов. ПЦР проводили на приборах "Терцик" (ДНК-технология) с

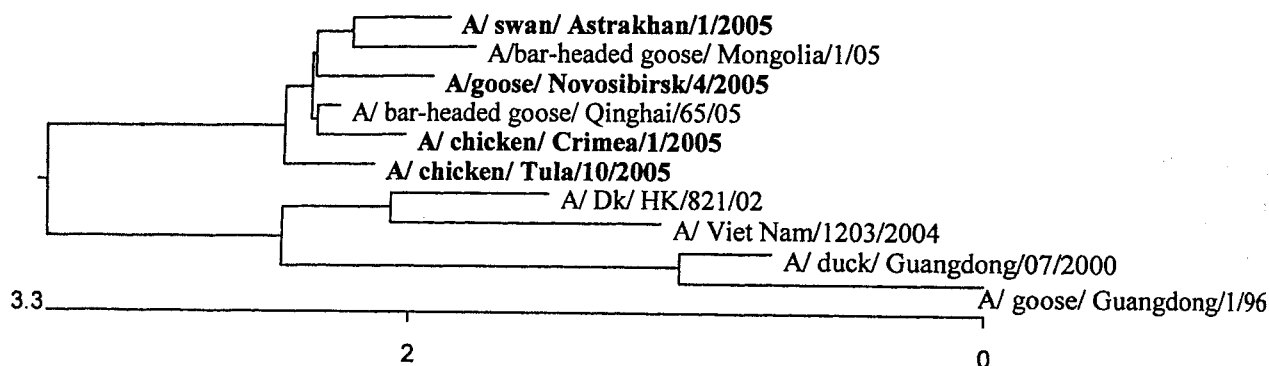


Рис. 1. Филогенетическое древо по гену гемагглютинаина.

использованием реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ. Фрагменты амплификации секвенировали методом "cycle sequence" с набором ABI PRISM Big Dye™ v.1.1 (Applied Biosystems, США), согласно инструкции изготовителя с использованием ABI-3100 PRISM™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Для проведения анализа данных секвенирования и построения филогенетических деревьев использовался блок программ DNASTAR.

### Результаты и обсуждение

#### Филогенетический анализ

С целью проведения филогенетического анализа были секвенированы протяженные фрагменты 4-го и 6-го сегментов генома вирусов гриппа А/Н5N1 из материала Новосибирской, Тульской и Астраханской областей, а также из АР Крым. Полученные последовательности нуклеотидов депонированы в Gen Bank под номерами DQ212791, DQ212792, DQ279300, DQ279301, DQ320136, DQ320137, DQ340847, DQ340848. Результаты секвенирования показали, что циркулирующий в данной эпизоотии (2005 г.) вирус по этим сегментам наиболее близок вирусу гриппа А/Н5N1, выделенному от диких водоплавающих птиц, павших при эпизоотии в мае—августе 2005 г. в китайской провинции Qinghaihu на озере Цинхай, которое является местом скопления мигрирующих птиц из Южной Азии, Новой Зеландии, Австралии и Сибири [21].

Гомология секвенированных изолятов А/goose/Novosibirsk/4/2005 (H5N1), А/chicken/Tula/10/2005 (H5N1), А/swan/Astrakhan/1/2005 (H5N1), А/chicken/Crimea/1/2005 (H5N1) и изолятов от диких водоплавающих птиц с озера Цинхай [например, А/Bar-headed goose/Qinghai/12/05(H5N1)], а также изолятов от диких птиц из Монголии (например, А/Bar-headed goose/Mongolia/1/05(H5N1)) по гену гемагглютинаина составила от 99,2 до 99,5% (рис. 1) и по гену нейраминидазы — от 99,5 до 99,7% (рис. 2). Гомология среди изолятов из России и АР Крым по аминокислотной последовательности гемагглютинаина составила от 100 до 99,5% (рис. 3). При этом максимальное сходство наблюдалось среди изолятов А/chicken/Crimea/1/2005 и А/goose/Novosibirsk/4/2005 (100%). В то же время эти изоляты показали максимальное сходство с изолятами Цинхай (99,8%). Максимальные различия с изолятами Цинхай зарегистрированы у изолята А/swan/Astrakhan/1/2005 (0,5%). Между изолятами А/chicken/Tula/10/2005 и А/bar-headed goose/Mongolia/1/05 также наблюдалось максимальная степень различий (1,2%).

Гомология изолятов из России и Украины по аминокислотной последовательности нейраминидазы составила от 100 до 99,1% (рис. 4). При этом максимальная гомология наблюдалась между изолятами А/chicken/Crimea/1/2005 и А/goose/Novosibirsk/4/2005, а также А/Bar-headed Goose/Qinghai/65/05 (100%). Максимальные различия составили

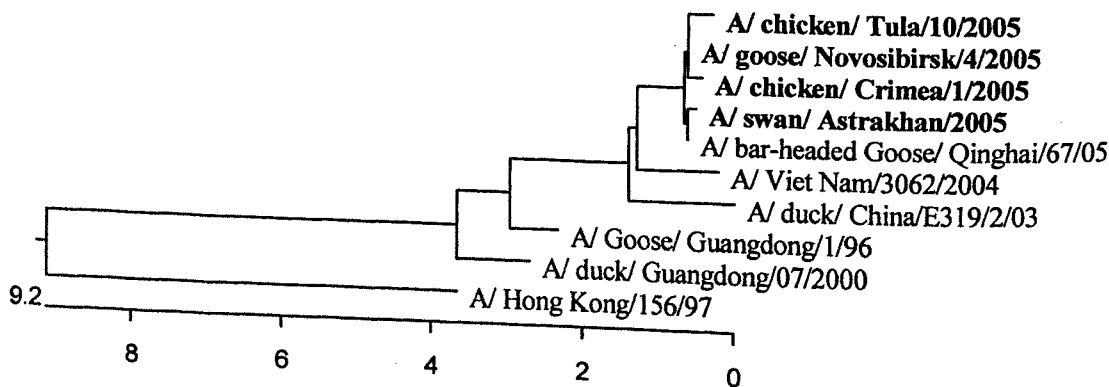


Рис. 2. Филогенетическое древо по гену нейраминидазы.

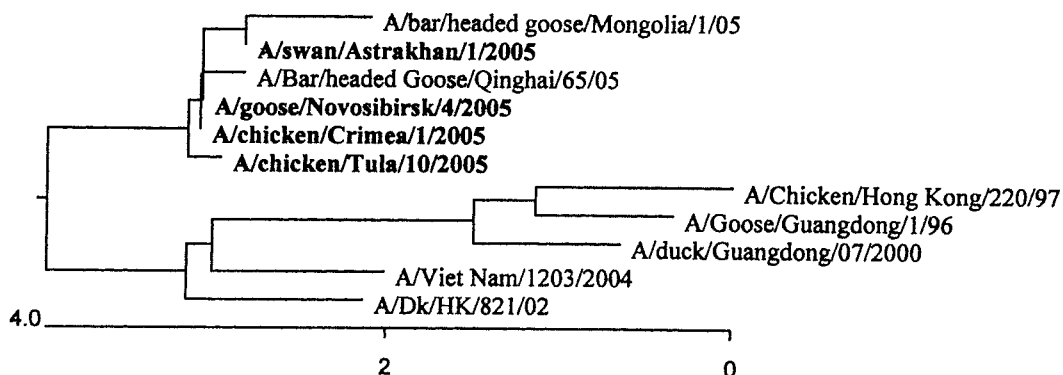


Рис. 3. Филогенетическое древо по аминокислотным последовательностям гемагглютинина (421 а.к.).

0,9% между изолятами A/chicken/Tula/10/2005 и A/swan/Astrakhan/1/2005 и 0,6% между изолятами A/chicken/Tula/10/2005 и A/Bar/headed Goose/Qinghai/65/05.

Следует отметить, что филогенетический анализ по гену гемагглютинина изолятов птичьего гриппа H5N1 эпизоотий 1997, 2003, 2004 и 2005 гг. в Азии отражает их группировку в 3 основных клайда, характерных для определенных не перекрывающихся географических регионов Азии. В первый клайд входят изоляты, циркулировавшие в 2003, 2004 и 2005 гг. на территории Вьетнама, Таиланда, Лаоса, Малайзии и Камбоджи, во второй клайд входят изоляты, циркулировавшие в 2004 и 2005 гг. на территории Китая, Индонезии, Японии и Южной Кореи. Третий клайд формируют изоляты, циркулировавшие в 1997 г. на территории Гонконга. Показано, что заболевания людей со смертельным исходом вызывали только изоляты, принадлежащие к первому и третьему клайдам [36]. Изоляты, обнаруженные во время эпизоотии 2005 г. на территории России и АР Крым, по нуклеотидной последовательности гена гемагглютинина следует отнести ко второму клайду (рис. 5). Изоляты вируса гриппа H5N1, отнесенные к этому клайду, были выделены во время эпизоотии 1997 — 2005 гг. в Азии только от павших птиц, что может косвенно свидетельствовать о меньшей патогенности этого варианта гемагглютинина для людей.

#### Анализ молекулярных маркеров патогенности

В геноме вируса гриппа выделяют несколько участков, определяющих его патогенность, это — 4-й сегмент, кодирующий гемагглютинин (НА), 6-й сегмент, кодирующий нейраминидазу (НА), и 8-й сегмент, кодирующий неструктурные белки. Гемагглютинин является основным поверхностным белком вируса, функционирующим в форме гомотримера в качестве видоспецифичного лиганда сиаловых рецепторов, находящихся на поверхности клеток организма хозяина, и тем самым играет ключевую роль на первом этапе репликативного цикла вируса (проникновение в клетки). Нейраминидаза является поверхностным, связанным с мембраной и функционирующим в форме тетрамера ферментом, катализирующим отщепление нейраминовых кислот от сиаловых рецепторов в процессе высвобождения нового поколения вирусов из клеток хозяина. Таким образом, для проявления инфекционной активности вируса необходимо оптимальное сочетание аффинности гемагглютинина и каталитической активности нейраминидазы [25, 33], функции которых по сути противоположны.

Известно, что вирусы гриппа способны приспосабливаться к организму природного хозяина вследствие мутационного процесса, затрагивающего в первую очередь структуру гемагглютинина. Обнаружено, что вирус гриппа субтипов H1N1 и H3N2 в респираторном тракте человека в начале инфекционного процесса реплицируется только в

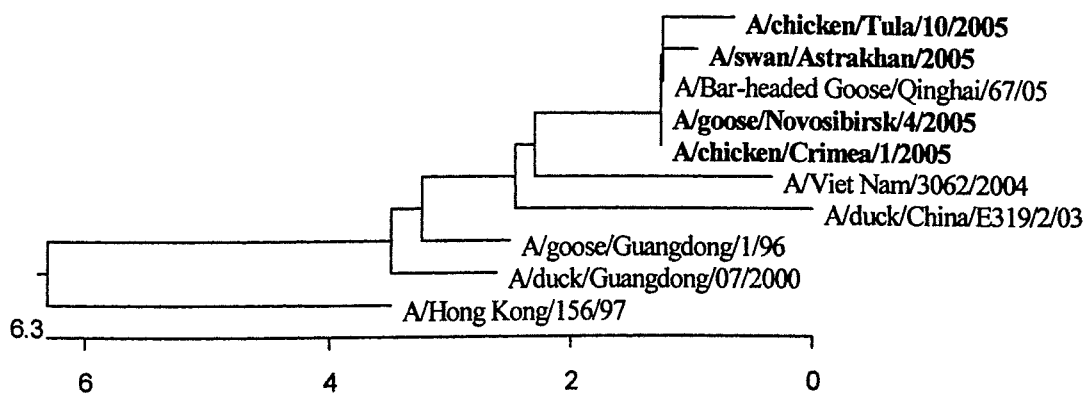


Рис. 4. Филогенетическое древо по аминокислотным последовательностям нейраминидазы (357 а.к.).

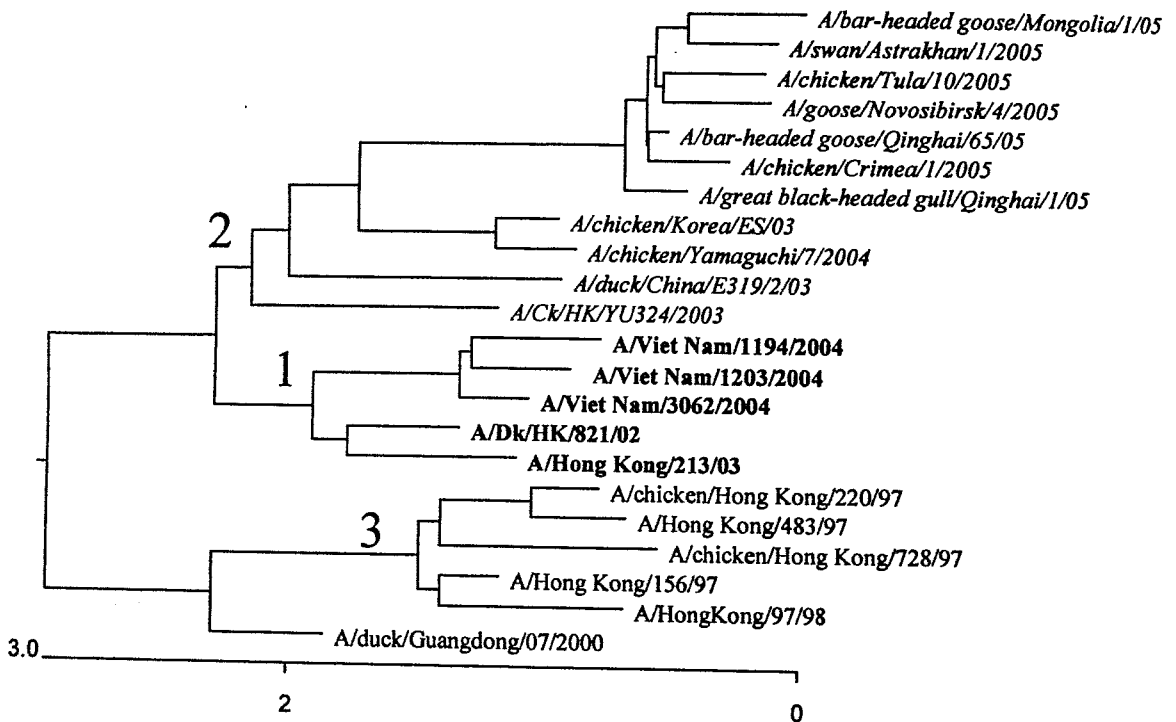


Рис. 5. Филогенетическое древо по гену гемагглютинаина.

Жирным шрифтом выделены последовательности, группирующиеся в первый клайд, курсивом выделены последовательности, группирующиеся во второй клайд.

секреторных клетках, которые имеют рецепторы Neu5Ac(2–6)Gal [25], в то время как вирусы гриппа, выделенные из организма птиц, имеют сродство к сиаловым рецепторам Neu5Ac(2–3)Gal, распространенным в респираторном тракте и кишечнике птиц. Отмечено, что ряд аминокислот (138, 159, 190, 225–228) в области связывания с рецепторами высококонсервативны в изолятах от птиц, и в то же время отличаются от аминокислот в изолятах тех же субтипов, выделенных от млекопитающих [15, 23, 24, 32]. Помимо этого, у изолятов вируса гриппа, выделенных от млекопитающих, при культивировании на куриных эмбрионах появляются мутации адаптации к рецепторам птиц [37]. В таблице приведены консервативные для изолятов птиц аминокислоты молекулы гемагглютинаина, участвующие во взаимодействии с рецепторами, характеризующие видовую приспособленность вируса гриппа различных субтипов к организму природного хозяина. Как видно из таблицы, циркулировавшие в эпизоотии 2005 г. на территории РФ и АР Крым вирусы H5N1 имели структуру гемагглютинаина, по всем ключевым аминокислотам характерную для связывания с рецепторами птиц. Все представленные на данный момент в свободном доступе последовательности гемагглютинаина гриппа H5N1, выделенные от инфицированных (и впоследствии умерших) людей, также содержат аминокислоты, характерные для "птичьих" изолятов. Факт инфицирования людей неадаптированным вирусом можно объяснить тем, что "птичьи" рецепторы Neu5Ac(2–3)Gal имеются в респираторном тракте человека в клетках реснитчатого эпителия

[25]. Нельзя исключить и возможность инфицирования вирусом H5N1 не только реснитчатых, но и секреторных клеток респираторного тракта человека. Отмечено, что на поздних стадиях инфекционного процесса репликация вируса гриппа H3N2 регистрируется и в клетках реснитчатого эпителия [25]. Таким образом, вирусы гриппа могут связываться с менее гомологичными рецепторами, но, по-видимому, с меньшей аффинностью. Тот факт, что у инфицированных гриппом A/H5N1 людей в 50–70% случаев наблюдается диарея, говорит о возможности инфицирования вирусом и клеток желудочно-кишечного тракта.

Аффинность связи молекулы гемагглютинаина также зависит от наличия сахаров в области связывания с рецепторами. Известно, что гликозилирование молекулы нейраминидазы по аминокислоте Asp в положении 158 (нумерация указана по последовательности субтипа H3) ослабляет ее связь с рецептором. Такой вариант гемагглютинаина часто сочетается с нейраминидазой, обладающей сниженной активностью вследствие делеций в N-концевой области фермента. Таким образом, данная модификация гемагглютинаина дает возможность вирусу эффективно реплицироваться [9], компенсируя сниженную активность нейраминидазы. Три из обследованных нами изолятов (A/goose/Novosibirsk/4/2005 (H5N1), A/chicken/Tula/10/2005 (H5N1), A/chicken/Crimea/1/2005 (H5N1)) в положении 158 имели Asp. В изоляте A/swan/Astrakhan/1/2005 (H5N1) в положении 158 находится Asp. Таким образом, во всех изолятах во время посттрансляционного процессинга гемагглютинаина в этом

**Ключевые аминокислоты в области связывания гемагглютинина с сialовыми рецепторами**

Субтип	Нумерация аминокислот (по субтипу H3)							
	138	158	159	190	225	226	227	228
<b>Хозяин</b>								
<b>HA1</b>								
Avian	A	G	T	E	G	Q	A	G
Classical swine	A	G	N, S	D	N, G, D	Q, L	A, E	G, S
Human	S	N	G, S	D	E, D	L, R	E	S
<b>HA2 HA3</b>								
Avian	A	?	N	E	G, E	Q	S	G
Swine	A	?	S, N	D	D, E	Q	S, I	S, G
Human	A	?	Y, F	D	D	L	I	S
<b>HA9</b>								
Avian	A	N	N	A, V	G	Q	Q	G
Swine	A	N	N	V, A	G	L, Q	H	G
Human	A	S	N	E, V, A	G	L, I	Q	G
<b>HA5</b>								
Avian	A	N, D	N	E	G, N	Q	S	G
Swine	A	N	S, N	E, V, D	G	L, I	S, I	G
Human	A	N	S	? D	? D	? L, I	? I, N	? S
<b>H5N1 2005 г.</b>								
Novosibirsk	A	N	N	E	G	Q	S	G
Tula	A	N	N	E	G	Q	S	G
Astrakhan	A	D	N	E	G	Q	S	G
Crimea	A	N	N	E	G	Q	S	G

Примечание. Курсивом выделены аминокислоты, которые определены по информации Gene Bank, но не упоминались ранее в публикациях. Жирным шрифтом отмечены данные настоящего исследования. Вопросительным знаком отмечены аминокислоты для HA5, предполагаемые по аналогии с другими субтипами.

положении будет происходить N-гликозилирование аминокислот. Все исследованные в данной работе изоляты также имели делецию в гене нейраминидазы (20 аминокислот в позициях 49–68) (рис. 6). Отмечено, что в этой области нейраминидазы часто встречаются делеции разного количества аминокислот в изолятах от птиц, что можно считать маркером адаптации вируса к их организму, и такой вариант фермента является менее активным по сравнению с полноразмерной молекулой [22].

Молекула гемагглютинина вируса A/H5N1 содержит еще один локус патогенности. Во время посттрансляционного процессинга предшественник гемагглютинина (HA0) подвергается протеолитическому расщеплению на фрагменты HA1 и HA2 под действием протеаз, синтезируемых инфицированными клетками респираторного (у человека) и желудочно-кишечного (у птиц) тракта. Наличие в сайте протеолитического расщепления предшественника гемагглютинина участка из 4–6 основных

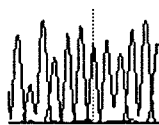
аминокислот делает фрагмент доступным для протеолиза фуриноподобными протеазами, распространенными в клетках разнообразных тканей [19]. Исследованные в данной работе изоляты содержали в области сайта протеолиза гемагглютинина 6 основных аминокислот (PQGERRRKKR/GL) (рис. 7). Такой вариант гемагглютинина ассоциирован с высоким индексом патогенности для птиц отряда куриные (Galliformes), мышей и, вероятно, для человека [16]. По данным исследователей, проводивших многолетний мониторинг изолятов гриппа у перелетных птиц в России, изоляты с подобной структурой сайта протеолиза гемагглютинина ранее не обнаруживались [2].

Восьмой сегмент вируса гриппа кодирует мРНК, подвергающуюся альтернативному сплайсингу с образованием двух белков (NS1 и NS2), из которых NS1 обнаруживается только в инфицированных клетках и является одним из факторов вирулентности. Известно, что NS1 участвует в регуляции экспрессии белков в инфицированных клетках, с одной стороны, подавляя синтез белков противовирусной защиты [13], с другой стороны, приводя к дисбалансу цитокинового ответа, что выражается в увеличении выработки провоспалительных и снижении продукции противовоспалительных цитокинов [20].

Обнаружено, что наличие аминокислоты Glu в позиции 92 гена NS1 способствует большему проявлению патогенных свойств вируса A/H5N1, тогда как изменение этой аминокислоты на Asp с помощью сайт-направленного мутагенеза приводит к снижению титра вируса и уменьшает смертность инфицированных мышей [20]. Изолят A/Hong Kong/156/97(H5N1) (HK/156/97) содержал Glu в позиции 92 гена NS1. Все изоляты вируса A/H5N1, выделенные от людей в Гонконге в 1997 г., также содержали Glu в позиции 92 гена NS1, и этот же вариант гена встречался в изолятах различных субтипов, выделявшихся от птиц, и в изоляте A/H9N2, выделенном в Гонконге от человека в 1999 г. [17]. В исследованных нами изолятах вируса A/H5N1 присутствует делеция 5 аминокислот в положении 80–84 последовательности белка NS1. Этим они отличаются от изолятов H5N1 1997 г. и похожи на изоляты 2003–2005 гг., в том числе выделенные от людей. Исследованные изоляты содержат Asp в позиции гена NS1, соответствующей позиции 92 изолята HK/156/97, которая вследствие делеции сдвигается в изолятах 2005 г. на положение 87 аминокислотной последовательности.

Исследователи под руководством С. W. Naeve [29] обратили внимание на то, что на карбоксиль-

GlnAlaGluProCysAsnGlnSerIleIleThrTyrGluAsnAsnThrTrpValAsnGlnThrTyrValAsnIleSerAsnThr:



CAAGCTGAACCA



ATCAGCAATCT

caggctgaaccgtgcaatcaaagcattattacttatgaaaacaacacctgggtaaatcagacatatgtcaacatcagcaatacc:

Рис. 6. Нуклеотидная последовательность гена нейраминидазы.

Подчеркнута делеция 20 аминокислот в позиции 49–68.

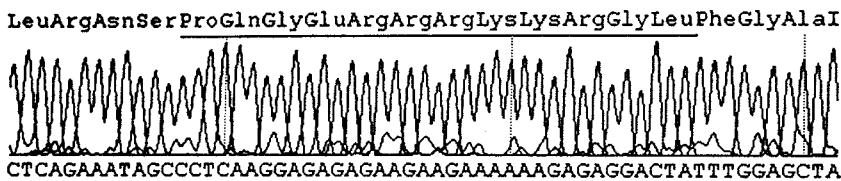


Рис. 7. Район сайта протеолитического расщепления молекулы гемагглютинина (PQGERRRKKR/GL).

ном конце белка NS1 представлен мотив (ESEV-COOH), с которым специфически связываются белки, содержащие PDZ-домены [31]. Известно, что протеины, содержащие PDZ-домены, играют ключевую роль в организации сигнальных путей, в том числе при активации пролиферации Т-клеток и формировании постсинаптических рецепторов путем обеспечения транспортировки протеинов в мембраны. Вирусы гриппа, инфицирующие птиц, преимущественно содержат аминокислоты Е или G в положении 1 указанного мотива, в то время как вирусы гриппа, инфицирующие людей, в 92% случаев содержат аминокислоту R. Изоляты от свиней содержат все варианты аминокислот. Экспериментальным путем с использованием протеиновых чипов была показана меньшая эффективность связывания с PDZ-доменами NS1-белков, содержащих мотивы RSKV, по сравнению с NS1-белками, содержащими мотивы ESEV [29]. Следует отметить, что вызвавшие высокую смертность изоляты вируса H5N1, выделенные от людей во время вспышек 1997—1999 гг. в Гонконге и во время вспышек 2003—2004 гг. в Гонконге, Вьетнаме и Таиланде, содержали мотивы, характерные для птичьих изолятов, — EPEV и ESEV соответственно. В то время как изоляты вирусов гриппа пандемии 1957 г. (H2N2) и 1968 г. (H3N2) содержали мотив, не характерный для птичьих изолятов (RSKV), и гораздо реже приводили к смертельному исходу. Изолят вируса гриппа пандемии 1918 г. (H1N1) имел уникальный мотив KSEV. Изоляты вируса гриппа птиц, выделенные в 2005 г. в России и АР Крым, имеют мотив ESKV, т. е. "птичьего" типа, и следовательно, обладают большой потенциальной способностью нарушать регуляцию функций инфицированных клеток человека.

**Анализ резистентности к противовирусным препаратам**

В настоящее время для специфической терапии гриппа используют ремантадин и амантадин — препараты, блокирующие ионные каналы, сформированные встроенным в оболочку вирусов гриппа А тетрамером белка M2 [4, 34].

За 20 лет применения ремантадина проблема резистентности к препарату была хорошо изучена. Уста-

новлено, что в популяции вирусов гриппа А, как правило, выделяют 9—14 % устойчивых к ремантадину изолятов H1N1, H3N2 [5, 10] и 30 % изолятов формирует резистентность к нему в процессе лечения [4]. По данным CDC, за сезон 2005—2006 гг. в Америке зарегистрирован необычно высокий удельный

вес (91%) резистентных к амантадину изолятов гриппа А/H3N2 [11]. Резистентность вирусов гриппа А к действию ремантадина обусловлена появлением одной из мутаций белка M2 в положении 26 (Leu-26-Phe), 27 (Val-27-Ala или Thr), 30 (Ala-30-Pro), 31 (Ser-31-Asn) и 34 (Gly-34-Glu), которые изменяют конфигурацию ионного канала [8]. Среди изолятов азиатского вируса гриппа А/H5N1, циркулировавших в 2003—2004 гг., преобладали резистентные к амантадину варианты, имеющие мутацию Ser-31-Asn [18]. Эта же мутация наиболее часто возникает в процессе лечения. У изолятов от людей и кур, циркулировавших во Вьетнаме в 2005 г., отмечено сочетание двух мутаций Leu-26-Phe и Ser-31-Asn [30]. Результаты секвенирования последовательностей гена M2 вируса гриппа А/H5N1 из материала Новосибирской, Тульской и Астраханской областей, а также из АР Крым показали, что ни один из семи изолятов не имел ни одной из указанных выше мутаций.

Преимущественно в зарубежной литературе для лечения гриппа рекомендуется применение ингибиторов нейраминидазы — озельтамивира (Тамиф-

- A/grebe/Novosibirsk/29/2005/H5N1
- A/duck/Novosibirsk/56/2005/H5N1
- A/duck/China/E319/2/2003/H5N1
- A/Viet Nam/3062/2004/H5N1
- A/chicken/Kurgan/3/2005/H5N1
- A/whooper swan/Mongolia/6/2005/H5N1
- A/Hanoi/30408/2005/H5N1
- A/goose/Guangdong/1/1996/H5N1
- A/whooper swan/Mongolia/3/2005/H5N1
- A/whooper swan/Mongolia/4/2005/H5N1
- A/bar-headed goose/Mongolia/1/2005/H5N1
- A/great black-headed gull/Qinghai/1/2005/H5N1
- A/chicken/Tula/10/2005/H5N1
- A/goose/Novosibirsk/4/2005/H5N1
- A/swan/Astrakhan/1/2005/H5N1
- A/chicken/Crimea/1/2005/H5N1
- A/Hong Kong/156/97/H5N1
- A/Viet Nam-HG/207/2005/H5N1
- A/Viet Nam-BL/014/2005/H5N1
- A/Viet Nam-DT/036/2005/H5N1

ASPAlaProAsnTyrHisTyrGluGluCys

3GATGCTCCTAATTATCATTATGAGGAGTG

A/swan/Astrakhan/1/2005/H5N1

Рис. 8. Секвенограмма фрагмента гена нейраминидазы. Мутация His-274-Тур (CAC-TAC) в образце A/swan/Astrakhan/1/2005/H5N1.

лю) и занамивира (Реленза), блокирующих активный центр фермента вирусов гриппа типов А и В [4].

Имеются данные о формировании резистентности вирусов гриппа субтипов А/Н1N1 и А/Н3N2 в 4–18 % случаев уже через 60 ч после начала приема озельтамивира [14, 28]. Описан ряд мутаций, вызывающих резистентность к озельтамивиру у субтипа А/Н1 [28] и к занамивиру у субтипов А/Н2 и А/Н9 по результатам экспериментов *in vitro* [27]. Мутации резистентности к озельтамивиру возникают в гене NA субтипа А/Н1 в положениях аминокислот 119 (Glu-119-Val), 274 (His-274-Tyr), 292 (Arg-292-Lys) и 294 (Asn-294-Ser). Мутации резистентности к обоим препаратам возникают у субтипов А/Н2 и А/Н9 в положениях 119 (Glu-119-Val, Gly, Ala, Asp) и 292 (Arg-292-Lys). В процессе лечения озельтамивиром людей, инфицированных гриппом А/Н5N1, наиболее часто регистрируются случаи возникновения мутаций в положениях 274 (His-274-Tyr) [12].

Последовательности гена нейраминидазы вируса гриппа А/Н5N1 из материала от павших домашних птиц из Новосибирской и Тульской областей, а также из АР Крым не имели ни одной из указанных выше мутаций. При анализе секвенированных последовательностей гена нейраминидазы вируса гриппа А/Н5N1 из материала от павших диких лебедей в дельте реки Волги в районе Астраханской области А/swan/Astrakhan/1/2005 (H5N1) обнаружена мутация His-274-Tyr (CAC-TAC) (рис. 8), обуславливающая резистентность к озельтамивиру. В проводившихся ранее исследованиях ВОЗ природно-резистентные к озельтамивиру изоляты вируса гриппа не обнаруживались [26].

Таким образом, эпизоотия гриппа у диких и домашних птиц в июле — декабре 2005 г. обусловлена переносом водоплавающими перелетными птицами из Китая нового высокопатогенного штамма вируса гриппа А/Н5N1, распространившегося затем по территории России и сопредельных стран.

Варианты вируса, циркулировавшие на данной территории с июля по декабрь, имели высокую гомологию по аминокислотной последовательности поверхностных белков, однако отличались от изолятов, выделенных в июле—августе 2005 г. в Монголии и во Вьетнаме. Этот факт говорит об одновременной циркуляции в популяции вирусов гриппа нескольких вариантов А/Н5N1.

Зарегистрирован ряд молекулярных маркеров, свидетельствующих о высокой патогенности циркулировавшего вируса для домашних птиц и млекопитающих, однако его эпидемическая активность в популяции людей до сих пор сдерживается отсутствием видоспецифичных мутаций гемагглютинина, обеспечивающих высокую степень репликации вируса в респираторном и желудочно-кишечном тракте людей.

Циркулировавшие в данной эпизоотии варианты вируса гриппа А/Н5N1 чувствительны к ремантадину, и в то же время в их природной популяции имеются варианты, резистентные к Тамифлю. Таким образом, в случае возникновения волны эпидемии гриппа необходимо проводить молекулярно-генетический анализ изолятов на наличие му-

таций резистентности к противовирусным препаратам с целью разработки правильной тактики профилактики и лечения инфицированных людей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф: (Сборник статей). — СПб., 2005.
2. Ломакина М. Ф., Федякина И. Т., Ямникова С. С. // Генодиагностика инфекционных болезней. — М., 2004. — Т. 2. — С. 228—232.
3. Львов Д. К., Шелканов М. Ю., Власов Н. А. и др. // Генодиагностика инфекционных болезней: Материалы Российской Науч.-практ. конф. (25—27 окт. 2005 г., Новосибирская область). — Новосибирск: ЦЭРИС, 2005. — С. 133—136.
4. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л. С. Страчунского и др. — М., 2002.
5. Шевченко Е. С., Бурица Е. И., Слепушкин А. Н. // Вопр. вирусол. — 2005. — № 5. — С. 32—35.
6. Шипулин Г. А., Яцышина С. Б., Подколзин А. Т. и др. // Инфекц. бол. — 2005 г. — Т. 3, № 4. — С. 25—29.
7. Яцышина С. Б., Подколзин А. Т., Терновой В. А. и др. // Генодиагностика инфекционных болезней: Материалы Российской Науч.-практ. конф. (25—27 окт. 2005 г., Новосибирская область). — Новосибирск, 2005. — С. 174—177.
8. Abed Y., Goyette N., Boivin G. et al. // Antimicrob. Agents. Chemother. — 2005. — Vol. 49, N 2. — С. 556—559.
9. Baigent S. J., McCauley J. W. et al. // Virus Res. — 2001. — Vol. 79. — P. 177—85.
10. Bright R. A., Medina M. J., Xu X. et al. // Lancet. — 2005. — Vol. 366. — P. 1175—1181.
11. Bright R. A., Shay D., Bresee J. CDC MMWR. 2006; 55 (2). <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5502.pdf>
12. de Jong M. D., Thanh T. T., Khanh T. H. // N. Engl J. Med. — 2005. — Vol. 353, N 25. — P. 2667—2672.
13. Geiss G. K., Salvatore M., Tumpey T. M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99, N 16. — P. 10736—10741.
14. Gubareva L. V., Kaiser L., Matrosovich M. N. et al. // J. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 183, N 4. — P. 523—531.
15. Ha Y., Stevens D. J., Skehel J. J. // EMBO J. — 2002. — Vol. 21, N 5. — P. 865—875.
16. Hatta M., Gao P., Halfmann P., et al. // Science. — 2001. — Vol. 293. — P. 1840—1842.
17. Lee C., Suarez D. L., Tumpey T. M. // J. Virol. — 2005. — Vol. 79, N 6. — С. 3692—3702.
18. Li K. S., Guan Y., Wang J. et al. // Nature. — 2004. — Vol. 430. — P. 209—13.
19. Lin Y. P., Shaw M., Gregory V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, N 17. — P. 9654—9658.
20. Lipatov A. S., Andreansky S., Webby R. J. // J. Gen. Virol. — 2005. — Vol. 86. — P. 1121—1130.
21. Liu J., Xiao H., Lei F. et al. // Science. — 2005. — Vol. 309, N 5738. — P. 1206.
22. Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. // J. Virol. — 1999. — Vol. 73. — P. 1146—1155.
23. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N. et al. // J. Virol. — 2000. — Vol. 74, N 18. — P. 8502—8512.
24. Matrosovich M., Krauss S., Webster R. et al. // Virology. — 2001. — Vol. 281, N 2. — P. 156—62.
25. Matrosovich M., Matrosovich T., Gray T. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101, N 13. — P. 4620—4624.
26. McKimm-Breschkin J., Trivedi T., Hampson A. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2003. — Vol. 47. — P. 2264—72.
27. McSharry J. J., McDonough A. C., Olson B. A. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2004. — Vol. 11, N 1. — P. 21—28.
28. Moscona A. // N. Engl. J. Med. — 2005. — Vol. 353, N 25. — С. 2633—2636.
29. Obenauer J. C., Denson J., Mehta P. K. // [www.sciencexpress.org/](http://www.sciencexpress.org/) 26 January 2006 / Page 3 / 10.1126/science.1121586.
30. Puthavathana P., Auewarakul P., Charoenying P. C. // J. Gen. Virol. — 2005. — Vol. 86. — P. 423—433.
31. Songyang Z., Fanning Z., Fu C. // Science. — 1997. — Vol. 275 — P. 73—77.
32. Vines A., Wells K., Matrosovich M. et al. // J. Virol. — 1998. — Vol. 72, N 10. — P. 7626—7631.
33. Wagner R., Wolff T., Herwig A. et al. // J. Virol. — 2000. — Vol. 74, N 14. — P. 6316—6323.
34. Wang C., Takeuchi K., Pinto L. H. et al. // J. Virol. — 1993. — Vol. 67. — P. 5585—5594.

35. WHO. H5N1 avian influenza. timeline.[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/timeline.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/timeline.pdf).
36. WHO. Emerging Inf Diseases. 2005; [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). — 11, N10.

37. Zhou N. N., Senne D. A., Landgraf G. // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73, N 10. — P. 8851—8856.

Поступила 12.04.06