

кластер с *M. hominis*. Впервые микоплазмы вида *M. primatum* были выделены у *S. aethiops* [8] из ротовой полости и урогенитальных смывов, что указывает на то что *M. primatum* — обычный обитатель *S. aethiops*. *M. primatum* была также выделена из урогенитального тракта у пациентов с проблемами фертильности [10].

Интересно, что нуклеотидные последовательности прототипного штамма *M. primatum* (AY779748), выявленного у *S. aethiops*, и штамма *M. primatum*, выявленного у *M. fascicularis*, почти полностью совпадают (99% гомологии). У обезьян вида *M. fascicularis* микоплазма вида *M. primatum* обнаружена впервые. Патогенность данного вида микоплазм для обезьян изучается.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 03-04-49517.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джикидзе Э. К., Марантиди А. Н., Балаева Е. Я. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1987. — № 10. — С. 23—27.
2. Кебу Т. И., Джикидзе Э. К., Чикобава М. Г. и др. // Биол. экспер. биол. — 2005. — Т. 130, № 2. — С. 215—218.
3. Basic DNA and RNA Protocols: Methods in Molecular Biology / Ed. A. J. Harwood. — Totowa; New Jersey, 1996. — Vol. 58. — P. 238—239.
4. Boom R., Sol C., Beld M. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37, N 3. — P. 615—619.
5. Cole B. C., Ward J. R., Graham C. E. // Can. J. Microbiol. — 1970. — Vol. 16. — P. 1331—1339.
6. DelGiudice R. A., Carski T. R., Barile M. F. et al. // Nature. — 1969. — Vol. 222. — P. 1088—1089.
7. DelGiudice R. A., Carski T. R., Barile M. F. et al. // J. Bacteriol. — 1971. — Vol. 108, N 1. — P. 439—445.
8. Madden D. L., Hildebrandt R. J., Monif G. R. G. et al. // Lab. Animal Care. — 1970. — Vol. 20. — P. 467—470.
9. Madden D. L., Hildebrandt R. J., Monif G. R. et al. // Lab. Animal Care. — 1970. — Vol. 20. — P. 471—473.
10. Thomsen A. C. // Acta Pathol. Microbiol. Scand. — 1974. — Vol. 5. — P. 653—656.
11. Yoshida T., Maeda S., Deguchi T. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40, N 1. — P. 105—110.

Поступила 26.12.06

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE MYCOPLASMA ISOLATED FROM THE JAVANESE MACAQUE (*M. FASCICULARIS*)

M. G. Chikobava, E. K. Dzhikidze, D. V. Zadorozhnyi, T. I. Kebu, I. M. Arshba, V. A. Kalashnikova, and A. A. Agumava

Research Institute of Medical Primatology, Russian Academy of Medical Sciences

The nucleotide sequence of the fragment of 16S-rRNA of mycoplasma was determined. The fragment was identified using the PCR method in the urogenital scrape of the Javanese macaque (*M. fascicularis*). The sequenced fragment of mycoplasma of *M. fascicularis* was compared to well-known sequences of mycoplasma of mammals. The results of our comparative and phylogenetic analyses of the sequenced DNA fragment revealed that the mycoplasma belonged to the *M. primatum* species and fell within the same cluster as *M. hominis*. The mycoplasma *M. primatum* was for the first time observed in the monkeys *M. fascicularis*. The pathogenicity of the mycoplasma species with respect to monkeys is being studied.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 578.832.1.683.3:577.21

С. Б. Яцышина¹, А. М. Шестопалов², В. А. Евсеев², Т. С. Астахова¹, С. И. Браславская¹, В. А. Терновой¹, Т. Ю. Кондратьева¹, А. Ю. Алексеев², С. И. Золотых², Ю. Н. Рассадкин², А. В. Зайковская², А. Г. Дурыманов², С. В. Нетесов², Г. А. Шипулин¹

ИЗОЛЯЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА А/Н5N1, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШЕК ГРИППА У ПТИЦ В 2005 Г. В ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ: ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММА ВИРУСА С МУТАЦИЕЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ОЗЕЛЬТАМИВИРУ

¹ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, ²ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл.

Проведены выделение и характеристика вирусов А/Н5N1 от павших во время осенней фазы эпизоотии 2005 г. курицы в селе Яндовка Тульской области и дикого лебедя в дельте реки Волги на участке Каралатской бороздины. Проведен молекулярно-биологический и филогенетический анализ изолятов с целью определения географического места происхождения штаммов и филогенетического родства вирусов, а также оценки их патогенности, эпидемической опасности для людей и возможной резистентности к противовирусным препаратам. Показано, что вирус относится к высокопатогенным вариантам, возникшим в Китае в результате реассортации циркулировавших в резервуарах диких и домашних птиц вирусов, относящихся к генотипам Z и V. Выявлен ряд молекулярных маркеров, свидетельствующих о высокой патогенности вируса для птиц отряда куриных и млекопитающих, но не обнаружены специфические мутации в гене гем-агглютинаина, обеспечивающие высокую степень репликации вируса в организме человека, и мутации адаптации к нему в генах внутренних белков. Показано, что циркулировавшие в данной эпизоотии варианты вируса гриппа А/Н5N1 чувствительны к ремантадину. В материале от дикого лебедя обнаружен вариант вируса, имеющий мутацию резистентности к Тамифлю.

В июле 2005 г. впервые в России была зарегистрирована крупная эпизоотия, вызванная вирусом гриппа А/Н5N1 среди домашней и дикой птицы, которая началась на территории Новосибирской

области [2] и в дальнейшем распространилась в юго-западном направлении на Омскую, Тюменскую, Курганскую, Челябинскую, Астраханскую и другие области и регионы России, на сопредельные страны и страны Европы. Несмотря на то что на территории России случаев заболевания людей зарегистрировано не было, события в Турции и Азербайджане в 2006 г., где фиксировали случаи заболевания с высокой смертностью (33 и 62% соответственно), свидетельствуют о патогенности некоторых штаммов данного субтипа вируса для людей [38]. В связи с этим с каждой новой вспышкой, вызванной этим вирусом у птиц, возникает вопрос, насколько могут быть опасны эпидемически для людей штаммы вируса А/Н5N1 и могут ли они эволюционировать до такой степени, что вызовут эпидемии, а потом пандемию среди людей. Это опасное существует несмотря на то, что данный вирус имеет субтип, не вызывавший ранее пандемий, что, по всей вероятности, не может являться сильным препятствием, как это видно из истории эпидемий и пандемий гриппа А, когда каждая новая пандемия была вызвана новым вариантом исход-

ного вируса с новым или измененным субтипом. Так, последняя пандемия в 1977 г. была вызвана субтипом H1N1, пандемия 1968 г. — субтипом H3N2, 1957 г. — H2N2, 1918 г. — H1N1, 1900 г. — (предположительно) H3N8 [30], которые возникали в результате реассортации вирусов, циркулировавших в предпандемический период в популяциях людей и птиц.

Целью данной работы явились выделение вируса во время вспышки гриппа у птиц в России и его молекулярно-генетический анализ для определения филогенетического родства и возможных источников возникновения вируса, молекулярных детерминант патогенности для птиц и предположительно млекопитающих, а также попытка определить потенциальную чувствительность (или резистентность) выделенных вирусов к существующим ныне противогриппозным препаратам.

Материалы и методы

Сбор образцов и изоляция вируса. Материал от погибших птиц был собран во время осенней фазы эпизоотии 2005 г. Органы от погибших птиц были получены из Астраханской области — 2 пробы от диких лебедей (*Cygnus olor*) и Тульской области — 8 проб от домашних кур. Наличие в этих образцах вируса гриппа A/H5N1 было первично зарегистрировано с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) тест-системы АмплиСенс Influenza virus H5 (ФГУН ЦНИИЭ) [3].

Изоляцию вируса проводили в ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" на 10-дневных куриных эмбрионах (РКЭ) по стандартной методике [28] из следующего материала: гомогената легких от павшей в октябре 2005 г. домашней курицы из частного хозяйства в селе Яндовка Ефремовского района Тульской области и гомогената внутренних органов (легкое, трахея, селезенка) от павшего дикого лебедя (*Cygnus olor*) в дельте реки Волга на участке Каралатской бороздины в Астраханской области в ноябре 2005 г. Инкубацию эмбрионов проводили при 35°C. Аллантоисную жидкость собирали через 36–48 ч после введения инокулята в РКЭ. Всю экспериментальную часть исследования проводили в условиях лаборатории уровня BSL-3, оборудованной для работы с высокопатогенными вирусами птичьего гриппа.

Идентификация вируса. Первичная идентификация изолированного вируса гриппа А осуществлялась методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к консервативным участкам NP-гена вируса гриппа А согласно [18], а также с помощью ПЦР тест-системы АмплиСенс Influenza virus H5.

Серологическое титрование гемагглютинина выполнено с помощью реакции торможения гемагглютинации эритроцитов петуха с использованием типоспецифических сывороток со-

гласно [28]. Серологическое типирование нейраминидазы проводили методом ингибирования нейраминидазной активности специфическими сыворотками [28]. В качестве диагностической панели использовали антисыворотки, любезно предоставленные доктором Вебстером (Центр ВОЗ по экологии вируса гриппа птиц и животных, Мемфис, США) [28]. Кроме этого, проводили дополнительное подтверждение субтипа гемагглютинина выделенных изолятов методом секвенирования после ОТ-ПЦР с использованием субтипспецифичных праймеров для H1-H5-субтипов [18] и с использованием ПЦР тест-системы АмплиСенс Influenza virus H5.

Генетический и филогенетический анализ. Экстракцию РНК из суспензии вирусов проводили с использованием набора реагентов "Рибо-золь" (ФГУН ЦНИИЭ), реакцию обратной транскрипции проводили с концевым, универсального для всех сегментов праймера Uni12 с помощью фермента M-MLV (ФГУН ЦНИИЭ).

Для секвенирования протяженных участков всех сегментов вируса гриппа H5N1 были выбраны праймеры, образующие в процессе амплификации набор перекрывающихся фрагментов ДНК. ПЦР проводили на приборах "Терцик" ("ДНК-технология") с использованием реагентов производящей ФГУН ЦНИИЭ. Секвенирование фрагментов амплификации выполняли на базе ФГУН ЦНИИЭ методом cycle sequence с набором ABI PRISM Big Dye™ v.1.1 ("Applied Biosystems", США), согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM™ Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием блока программы DNASTAR по алгоритму Clustal.

Полученные последовательности нуклеотидов депонированы в базу данных GenBank под номерами DQ840518–DQ840533. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 3.1 методом Neighbor Joining по алгоритму Kimura 2-parameter с выполнением Bootstrap Test of Phylogeny (1000 повторов) [16].

Исследование патогенности на цыплятах. Тест на патогенность проводили с использованием десяти 6-недельных цыплят, зараженных внутривенно 0,1 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкостью, согласно стандартной методике [14, 34]. Для сравнения использовали штамм A/Turkey/Suzdalka/Nov-01/05, выделенный во время эпизоотии в Новосибирской области.

Результаты и обсуждение

Определение серотипа вирусов. В результате паспортирования на развивающихся куриных эмбрионах были выделены изоляты вируса гриппа А, получившие название A/chicken/Tula/Russia/Oct-5/2005 и A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005. Серологический анализ выделенных изолятов показал, что оба

Ключевые аминокислоты в области связывания гемагглютинина

Субтип	Хозяин	Нумерация аминокислот (по субтипу H3)							
		138	158	159	190	225	226	227	228
HA1	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
HA2	Avian	A	?N	N	E	G, E	Q	S	G
	Swine	A	?N	S, N	D	D, E	Q	S, I	S, G
HA3	Human	A	?S	Y, F	D	D	L	I	S
	Avian	A	N	N	A, V	G	Q	Q	G
	Swine	A	N	N	V, A	G	L, Q	H	G
HA5	Human	A	S	N	E, V, A	G	L, I	Q	G
	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
H5N1 2005 г.	Human	A	N	S	?D	?D	?L, I	?I, N	?S
	Novosibirsk	A	N	N	E	G	Q	S	G
	A/chicken/Tula/Russia/Oct-5/2005	A	N	N	E	G	Q	S	G
	A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005	A	D	N	E	G	Q	S	G

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

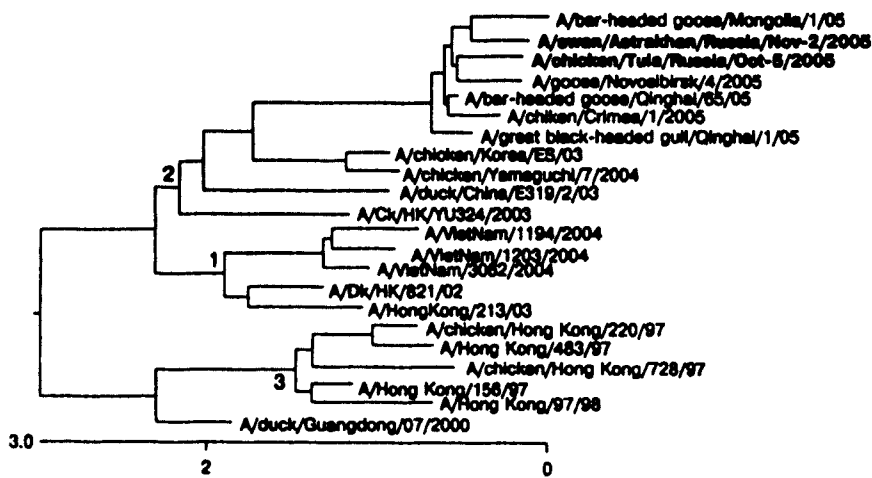


Рис. 1. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинина (HA — 1265 п. н.).

Здесь и на рис. 2–9 жирным шрифтом выделены последовательности, секвенированные в данном исследовании.

вируса имеют гемагглютинин, субтип H5, и нейраминидазу, субтип N1.

Исследование патогенности на цыплятах. Первые характерные для высокопатогенного вируса гриппа птиц клинические проявления заболевания и начало гибели цыплят были отмечены на 1-е сутки после инфицирования для всех взятых в опыт штаммов. 100% цыплят погибло в течение 3 дней, что характеризует все 3 штамма вируса как высокопатогенные.

Исследование молекулярных маркеров патогенности. В геноме вируса гриппа известно несколько участков, определяющих степень его патогенности, которые были исследованы в данной работе. В таблице приведены консервативные для видоспецифичных изолятов вируса гриппа А аминокислоты молекулы гемагглютинина, участвующие во взаимодействии с рецепторами и характеризующие его видовую приспособленность, а также аминокислоты, обнаруженные в изолятах вирусов, выделенных в данном исследовании (нумерация указана по последовательности субтипа H3). Обнаружено, что оба изолята содержали последовательность, кодирующую 6 основных аминокислот (PQGERRRKGR/GL) в сайте протеолиза гемагглютинина. В обоих изолятах обнаружены делеции в 6-м и 8-м сегментах, приводящие к потере 20 аминокислот в позициях 49–68 нейраминидазы и 5 аминокислот в позициях 80–84 белка NS1. В изоляте A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005 обнаружена последовательность, кодирующая Lys в 627-м положении белка PB2. Изолят A/chicken/Tula/Russia/Oct-5/2005 содержал последовательность, кодирующую Glu. В 8-м сегменте исследованных изо-

лятов обнаружена последовательность, соответствующая Asp в позиции 92 гена NS1, и последовательность, кодирующая мотив ESKV, представленный на карбоксильном конце белка NS1.

Исследование молекулярных маркеров резистентности к противовирусным препаратам. Проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов M2 и NA выделенных изолятов с целью выявления мутаций, вызывающих резистентность к препаратам амантадинового ряда и озельтамивиру. В последовательности гена NA изолята A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005 вируса гриппа A/H5N1 обнаружена мутация His274 Tyr (CAC-TAC).

Филогенетический анализ. С целью уточнения источников и механизмов происхождения изолятов высокопатогенного вируса H5N1, вызвавших эпизоотию гриппа птиц в 2005 г. в России, был проведен филогенетический анализ путем сравнения всех 8 сегментов изолятов вируса с представленными в GenBank последовательностями нуклеотидов, а также анализ литературы, классифицирующей изоляты высокопатогенного вируса гриппа A/H5N1 на генотипы, образующиеся в результате мутирования и реассортации [10, 11, 19]. Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 1–9.

Исследование молекулярных маркеров патогенности. Гемагглютинин является основным поверхностным гликопротеином вируса, функционирующим в форме гомотримера в качестве видоспецифичного лиганда сиаловых рецепторов, находя-

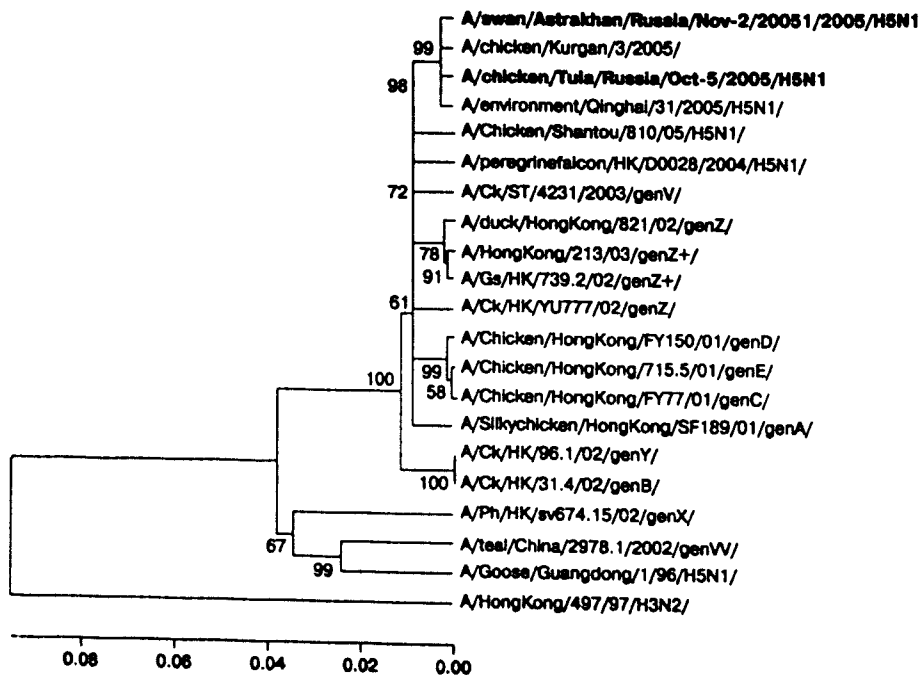


Рис. 2. Филогенетическое дерево по сегменту 1 (ген PB2) (2102 п. н.).

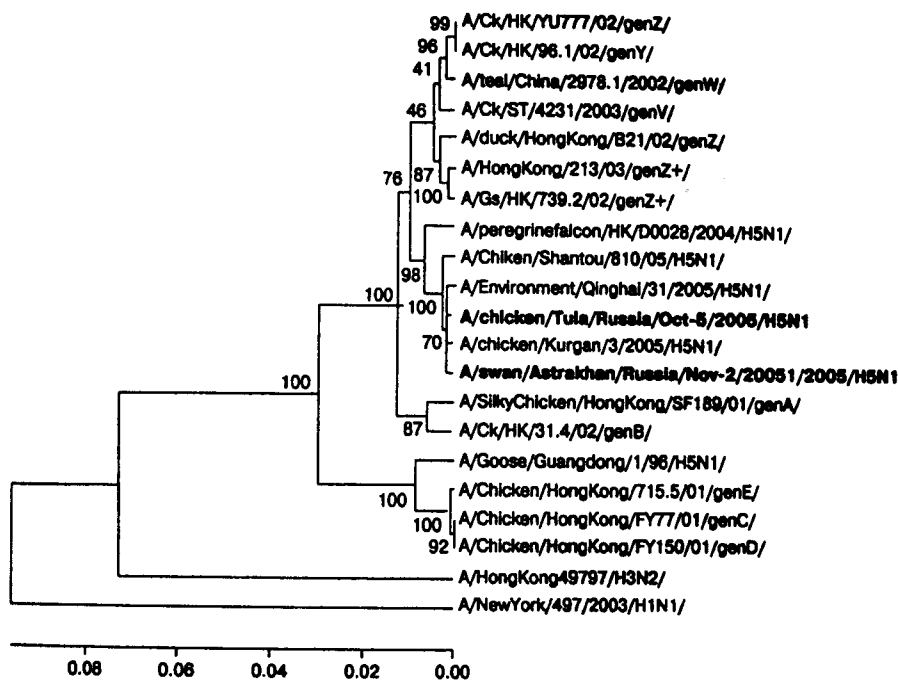


Рис. 3. Филогенетическое дерево по сегменту 2 (ген PB1) (2208 п. н.).

щихся на поверхности клеток организма хозяина, и играющим ключевую роль на этапе инфицирования. Вирусы гриппа H1N1 и H3N2 реплицируются преимущественно в секреторных клетках респираторного тракта человека, 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. В молекуле гемагглютинина имеется ряд аминокислот (138, 159, 190, 225—228 — нумерация указана по последовательности субтипа H3), расположенных в области связывания с рецепторами, которые высококонсервативны в изолятах от птиц и в то же время отличаются от соответствующих аминокислот у изолятов тех же субтипов, выделенных от млекопитающих [24, 35]. При этом у изолятов, выделенных от млекопитающих, при культивировании на куриных эмбрионах появляются мутации адаптации к рецепторам птиц [39]. Таким образом, вирусы гриппа способны адаптироваться к определенному виду хозяина вследствие мутационного процесса, затрагивающего в том числе и ген гемагглютинина. Хотя вопрос, можно ли полученные на других субтипах закономерности переносить на субтип H5N1, остается предметом дис-

куссий, исследования на микрочипах показали, что мутации, адаптирующие H3 к рецепторам Neu5Ac(2—6)Gal (G228S и сочетание G228S с Q226L), также снижают сродство H5 к рецепторам Neu5Ac(2—3)Gal и повышают специфичность их связей с гликанами рецепторов Neu5Ac(2—6)Gal [33]. Как видно из таблицы, выделенные и охарактеризованные в данном исследовании вирусы имели аминокислотные замены в гемагглютинине, по всем ключевым аминокислотам характерные для вирусов, связывающихся с рецепторами клеток птиц. Все представленные на данный момент в GenBank и открытые в свободный доступ последовательности гемагглютинина гриппа H5N1, выделенные от инфицированных (и впоследствии умерших) людей в 2005—

2006 г., также содержат эти маркерные аминокислоты, характерные для "птичьих" изолятов. Факт инфицирования людей неадаптированным вирусом птиц можно объяснить тем, что вирусы гриппа могут в принципе связываться и с другими рецепторами с меньшей аффинностью к ним. Например, отмечено, что на поздних стадиях инфекционного процесса репликация вируса гриппа H3N2 регистрируется и в клетках реснитчатого эпителия, которые имеют "птичьи" рецепторы Neu5Ac(2—3)Gal [25], поэтому нельзя исключить возможность инфицирования вирусом H5N1 секреторных клеток

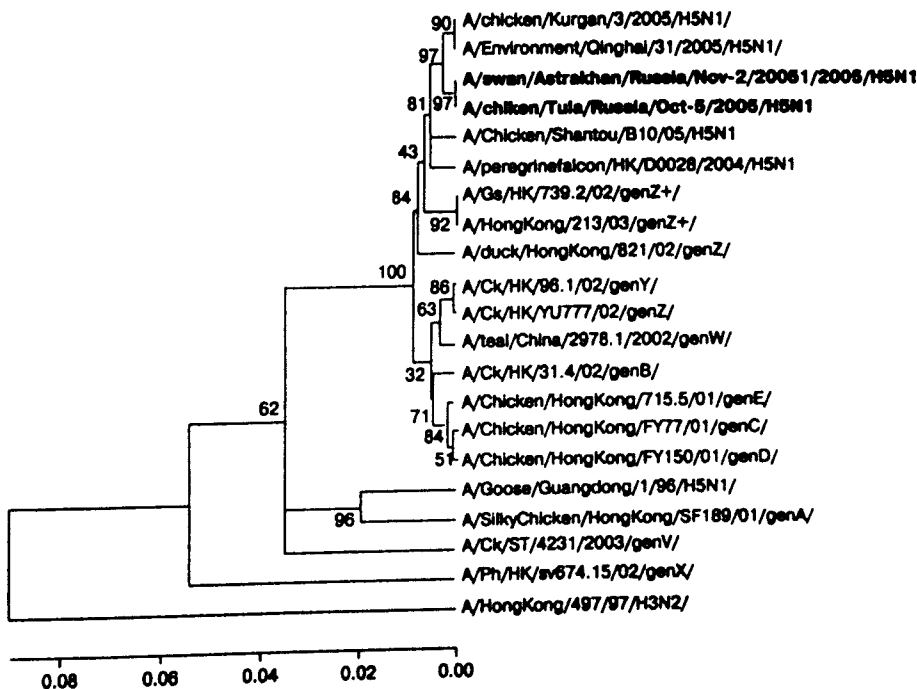


Рис. 4. Филогенетическое дерево по сегменту 3 (ген PA) (1990 п. н.).

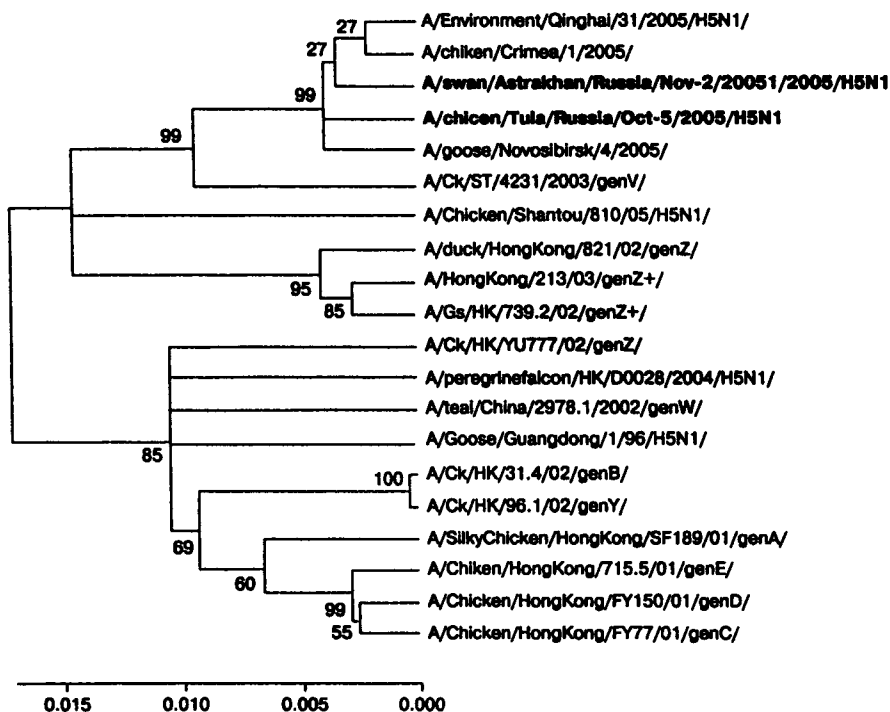


Рис. 5. Филогенетическое дерево по сегменту 4 (ген HA) (1265 п. н.).

верхних дыхательных путей человека. Тот факт, что у 7 из 10 инфицированных вирусом гриппа А/Н5N1 пациентов из госпиталей Хошимина и Ханоя (Вьетнам) [13] наблюдалась диарея, говорит и о возможности инфицирования вирусом клеток желудочно-кишечного тракта. Аффинность связи молекулы гемагглютинина также зависит от наличия модификаций этого белка в области связывания с рецепторами. Так, известно, что гликозилирование молекулы гемагглютинина по аминокислоте Asp в положении 158 ослабляет ее связь с рецептором. Такой вариант гемагглютинина часто сочетается с нейраминидазой, обладающей сниженной активностью вследствие делеций в N-концевой области фермента. Для проявления инфекционной активности вируса необходимо оптимальное сочетание аффинности гемагглютинина и активности нейраминидазы [25, 36], и данная модификация гемагглютинина дает возможность вирусу эффективно реплицироваться [5], компенсируя сниженную активность нейраминидазы. В выделенных нами изолятах в положении 158 гемагглютинина находились аминокислоты, по которым происходит гликозилирование аминокислот во время посттрансляционного процессинга белка. Оба изолята также имели делецию в гене нейраминидазы. Отмечено, что в изолятах

от кур в этой области нейраминидазы часто встречаются делеции различного количества аминокислот, что можно считать маркером адаптации вируса к их организму, и такой вариант фермента является менее активным по сравнению с полноразмерной молекулой [23]. Аминокислотная последовательность гемагглютинина вируса гриппа А содержит основной локус, по которому вирусы оцениваются как высоко- и низкопатогенные: сайт протеолитического расщепления. Наличие в этом сайте участка из 4–6 основных аминокислот делает фрагмент доступным для протеолиза фуриноподобными протеазами, распространенными в клетках разнообразных тканей [20]. Изученные в данной работе изоляты содержали в области сайта протеолиза гемагглютинина 6 основных аминокислот. Такой вариант гемагглютинина, как правило, ассоциирован с высоким индексом па-

тогенности для птиц отряда куриных (Galliformes), мышей и часто для человека [12]. По данным исследователей, проводивших мониторинг изолятов гриппа у диких птиц в России, изоляты с подобной структурой сайта протеолиза гемагглютинина не обнаруживались до июля 2005 г. [1, 2].

С помощью сайтнаправленного мутагенеза в эксперименте *in vivo* исследователями было показано, что замена аминокислоты в положении 627 белка PB2 может изменять эффективность репликации вируса гриппа А/Н5N1 в организме мышей

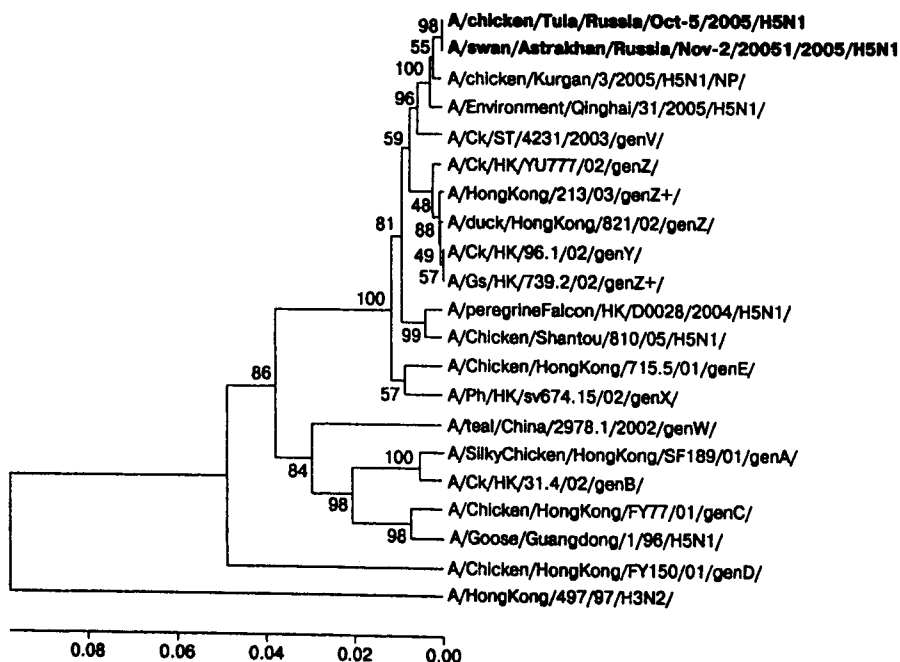


Рис. 6. Филогенетическое дерево по сегменту 5 (ген NP) (1425 п. н.).

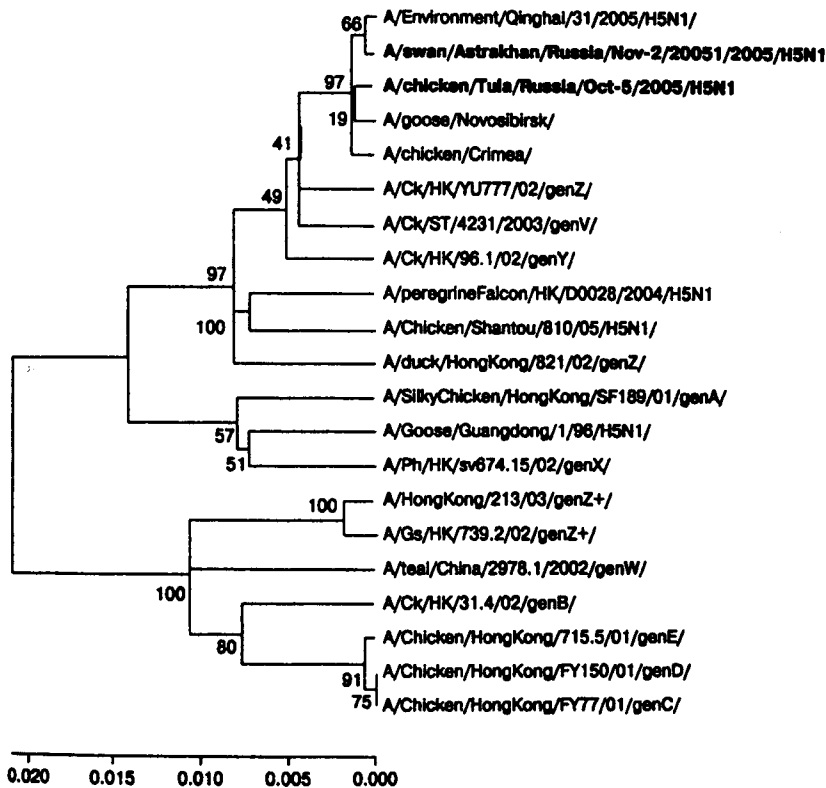


Рис. 7. Филогенетическое дерево по сегменту 6 (ген NA) (1080 п. н.).

[31]. Так, вирус, содержащий Lys в положении 627, вызывал системные инфекции, в частности реплицировался в мозге мышей, в то время как вирус, содержащий Glu, реплицировался преимущественно в легких и не приводил к летальному исходу. Один из изолятов (A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005) содержал последовательность, кодирующую Lys в положении 627 белка PB2.

Восьмой сегмент вируса гриппа кодирует неструктурные белки NS1 и NS2, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, 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, с другой — приводя к дисбалансу цитокинового ответа, что выражается в увеличении выработки провоспалительных цитокинов и снижении продукции противовоспалительных [9], однако локус гена, обеспечивающий эти функции, до сих пор не идентифицирован. При инфицировании мышей реассортантом A/Puerto Rico/8/34

(H1N1), содержащим различные варианты белка NS1 [21], было отмечено, что реассортант с A/Hong Kong/156/97, содержащим Glu в позиции 92 белка NS, в 1,5–2 раза сильнее стимулировал выработку в легких мышей провоспалительных цитокинов и хемокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8-подобный хемокин) по сравнению с исходным вирусом H1N1. Уровень противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10) в легких мышей при инфицировании таким реассортантом был в 2 раза ниже по сравнению с исходным вирусом H1N1. Изменение Glu92 на Asp в белке NS1 с помощью сайтнаправленного мутагенеза приводило к снижению титра вируса и уменьшению процента смертности инфицированных мышей, при этом в их легких уровень противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10) был в 2,5 раза выше, а уровень провоспалительных цитокинов — ниже, чем при инфицировании исходным вирусом H1N1. Подобную структуру гена имели все изоляты вируса A/H5N1, выделенные от людей в Гонконге в 1997 г., и изолят A/H9N2, выделенный 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

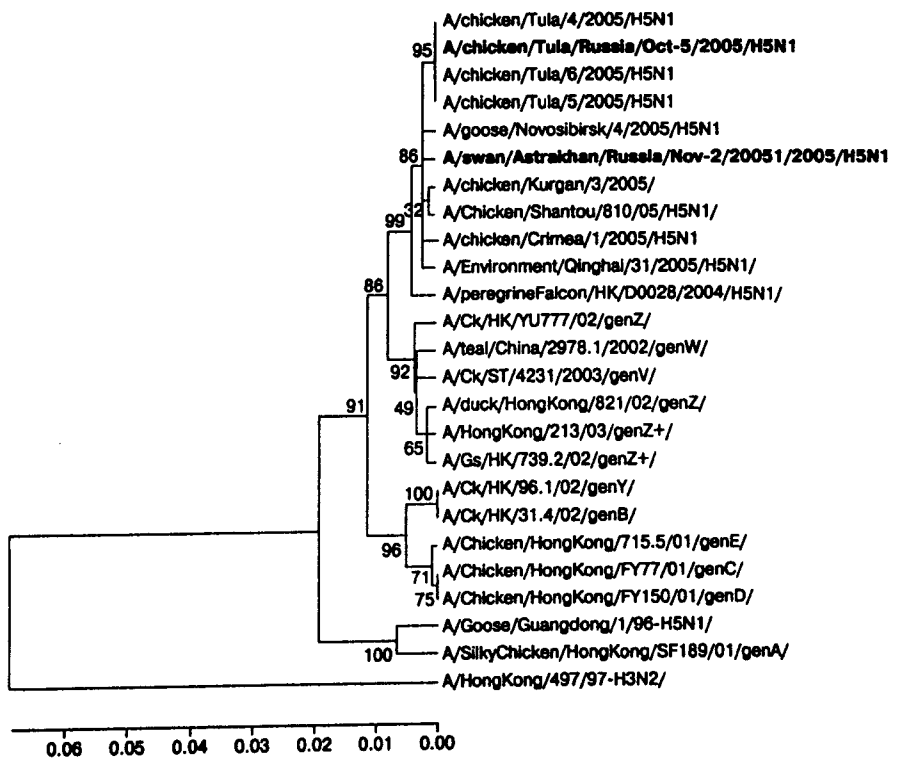


Рис. 8. Филогенетическое дерево по сегменту 7 (гены M2, M1) (823 п. н.).

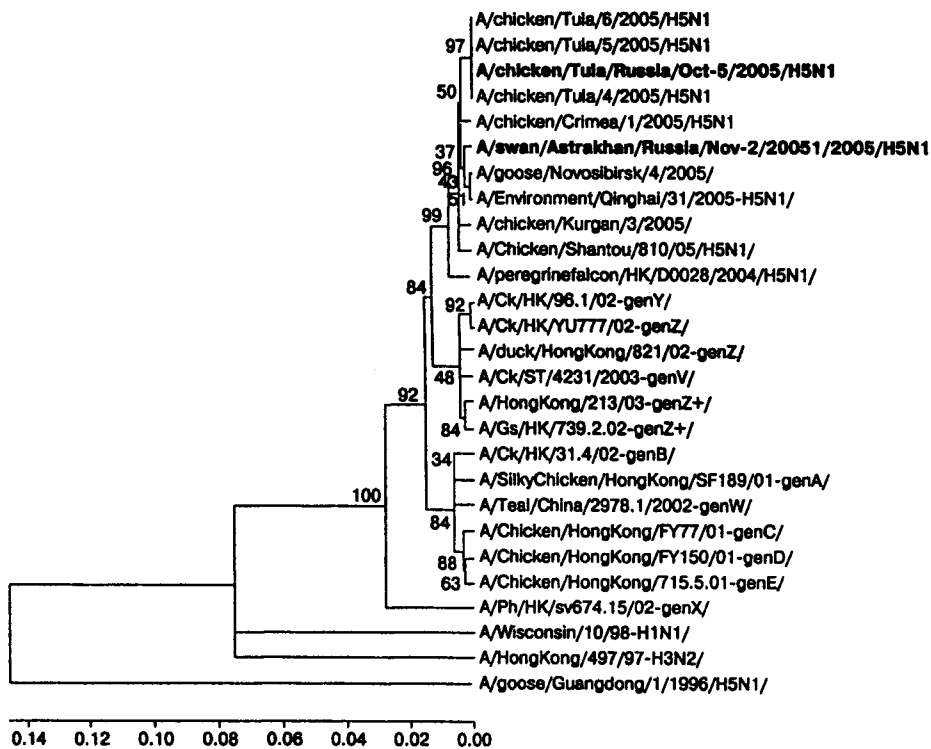


Рис. 9. Филогенетическое дерево по сегменту 8 (ген NS) (735 п. н.).

людей. Вследствие данной делекции позиция гена NS1, соответствующая положению 92 аминокислоты изолята НК/156/97, сдвигается в изолятах 2005 г. на положение 87, в котором расположен Asp. Таким образом, исследованные нами изоляты содержат Asp в позиции гена NS1, соответствующей положению 92 аминокислоты изолята НК/156/97. Исследователи под руководством С. Naeve [29] обратили внимание на то, что на карбоксильном конце белка NS1 представлен мотив (ESEV-COOH), с которым специфически связываются регуляторные белки, содержащие PDZ-домены [32], играющие ключевую роль в системе сигнальных путей. Замечено, что вирусы гриппа, адаптированные к организму птиц, преимущественно содержат аминокислоты E или G в положении 1 указанного мотива, в то время как вирусы гриппа, вызывающие ежегодные эпидемии гриппа у людей, в 92% случаев содержат аминокислоту R, причем мотивы RSKV обладают меньшим сродством к регуляторным белкам, чем мотивы ESEV или GCEV [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 эпидемий 1957 г. (H2N2) и 1968 г. (H3N2) содержали мотив RSKV и гораздо реже приводили к смертельному исходу. Изолят вируса гриппа пандемии 1918 г. (H1N1) имел уникальный мотив KSEV. Выделенные нами изоляты, а также все изоляты вируса A/H5N1 2005—2006 гг. из России и других стран, последовательности которых представлены в GenBank, имеют мотив ESKV, т. е. "птичьего" типа и, следовательно, могут обладать большой потенци-

альной способностью нарушать регуляцию цитокинового ответа.

Исследование молекулярных маркеров резистентности к противовирусным препаратам. В настоящее время для специфической терапии гриппа в России используют ремантадин и амантадин — препараты, блокирующие ионные каналы, сформированные встроенным в оболочку вирусов гриппа А тетрамером белка М2 [37]. За 20 лет применения ремантадина проблема резистентности к препарату была хорошо изучена. Установлено, что в популяции вирусов гриппа А, как правило, выделяют 9—14% устойчивых к ремантадину изолятов H1N1, H3N2 [6], однако, по данным CDC, за сезон 2005—2006 г. в США зарегистрирована необычно высокая доля (91%) резистентных к амантадину изолятов гриппа A/H3N2

[7]. Заслуживает внимания тот факт, что изоляты вирусов гриппа субтипов H5, H7 и H9, выделенные от домашней птицы в Юго-Восточной Азии и Северной Америке за 1979—1983 гг., были чувствительны к адамантанам (амантадину и ремантадину), в то время как более поздние (2000—2004 гг.) изоляты тех же субтипов из этих регионов от того же вида птиц обладали устойчивостью к данным препаратам в 31% случаев (субтип H5) и в 10—15% (субтип H7 и H9) [15]. За обсуждаемый период регистрировались лишь единичные случаи резистентности к адамантанам субтипа H6. Резистентность вирусов гриппа А к действию ремантадина (амантадина) может быть обусловлена появлением одной из мутаций белка М2 в положениях 26 (Leu26—Phe), 27 (Val27—Ala или Thr), 30 (Ala30—Pro), 31 (Ser31—Asn) или 34 (Gly34—Glu), которые изменяют конфигурацию ионного канала [4]. Результаты секвенирования последовательностей гена М2 вируса гриппа А/H5N1 у выделенных нами изолятов показали, что они не имели ни одной из указанных выше мутаций. Среди изолятов вируса гриппа А/H5N1, циркулировавших в Азии в 2003—2004 гг., преобладали резистентные к амантадину варианты, имеющие мутацию Ser31—Asn [19]. Эта же мутация наиболее часто возникает в процессе лечения людей. У изолятов от людей и кур, циркулировавших во Вьетнаме в 2005 г., было отмечено сочетание двух мутаций: Leu26—Phe и Ser31—Asn, что могло быть следствием неправильного профилактического применения этого препарата для домашней птицы.

В последнее время для лечения гриппа рекомендуется также применение ингибиторов нейраминидазы — озельтамивира (Тамифлю) и занамивира (Реленза), блокирующих активный центр этого фермента вирусов гриппа типов А и В. Описан ряд

мутаций, вызывающих резистентность к озельтамивиру у субтипа А/Н1 и к занамивиру у субтипов А/Н2 и А/Н9, по результатам экспериментов *in vitro* [27]. Мутации резистентности к озельтамивиру возникают в гене NA типа 1 в положении аминокислот 119 (Glu119—Val), 274 (His274—Tyr), 292 (Arg292—Lys) и 294 (Asn294—Ser). В процессе лечения озельтамивиром людей, инфицированных гриппом А/Н5N1, наиболее часто регистрируются случаи возникновения мутаций в положении 274 (His274—Tyr) [8]. Ни одна из вышеупомянутых мутаций не была обнаружена в последовательности гена NA изолята A/chicken/Tula/Russia/Oct-5/2005, однако в последовательности гена NA изолята A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005 вируса гриппа А/Н5N1 обнаружена мутация His274—Tyr (САС-ТАС). Проводившиеся ранее исследования не обнаруживали природно-резистентных к озельтамивиру изолятов вируса гриппа [22], но полученные нами данные свидетельствуют о наличии в популяции вируса 2005 г. резистентных к этому препарату изолятов и необходимости применять его для профилактики или лечения только после доказательства отсутствия резистентности в каждом конкретном случае.

Филогенетический анализ. Филогенетический анализ по гену гемагглютиниана изолятов вируса гриппа птиц Н5N1 эпизоотий 1997, 2003, 2004 и 2005 гг. в Азии отражает их группировку в 3 основные клайда [26], характерные для определенных неперекрывающихся географических регионов Азии. Так, в 1-й клайд входят изоляты, циркулировавшие в 2003, 2004 и 2005 гг. на территории Вьетнама, Таиланда, Лаоса, Малайзии и Камбоджи; во 2-й клайд — изоляты, циркулировавшие в 2004 и 2005 гг. на территории Китая, Индонезии, Японии и Южной Кореи; 3-й клайд формируют изоляты, циркулировавшие в 1997 г. на территории Гонконга. Российские изоляты (A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005 и A/chicken/Tula/Russia/Oct-5/2005) по нуклеотидной последовательности гена гемагглютиниана следует отнести ко 2-му клайду (см. рис. 1). Изоляты вируса гриппа Н5N1, отнесенные к этому клайду, были выделены только от павших птиц в отличие от представителей 1-го и 3-го клайдов, которые обнаруживали в клиническом материале от умерших людей, что может косвенно свидетельствовать о меньшей патогенности этого варианта гемагглютиниана для людей.

Исследователями [34] было показано, что высокопатогенный вирус Н5N1, вызвавший эпизоотию среди птиц и смертельные заболевания людей в Гонконге в 1997 г., возник в результате реассортации вирусов птиц, приобретя ген NA от изолятов, подобных A/goose/Guangdong/1/96 (Н5N1), ген NA от изолята, подобного A/teal/HongKong/W312/97 (Н6N1), и гены, кодирующие внутренние белки, от изолятов, подобных A/quail/HongKong/G1/97 (Н9N2) или A/teal/HongKong/W312/97 (Н6N1). В 2001 г. в популяции высокопатогенных вирусов Н5N1 на фермах и рынках розничной продажи Гонконга выделили 5 генотипов (А—Е), среди которых доминировал генотип А; в 2002 г. появились еще 4 генотипа (Х, Y, Z и Z+), а в 2003—2004 гг. появились новые 5 генотипов (V, W, X1, X2 и X3). Таким образом, доминировавший во время вспышки 2003—2004 гг. генотип Z сформировался в Южном Китае в 2002 г. среди домашних уток и затем

распространился через перелетных птиц по всей Азии [19].

Результаты филогенетического анализа показали, что оба российских изолята (A/swan/Astrakhan/Russia/Nov-2/2005 и A/chicken/Tula/Russia/Oct-5/2005) имеют высокую гомологию (> 99%) по всем восьми сегментам вируса с изолятами гриппа А/Н5N1, выделенными от диких перелетных водоплавающих птиц, павших на озере Цинхай (Китай) в мае 2005 г., а также позволили проследить путь возникновения данного генетического варианта вируса. Так, изоляты группы Цинхай (включая российские) по всем генам, кроме HA и NP, показали гомологию > 99% с изолятом, выделенным в 2004 г. в Гонконге от сапсана (A/peregrine Falcon/HK/D0028/2004/Н5N1), а по генам HA и NP > 98% гомологии с изолятами генотипа V, выделенными от кур (A/Ck/ST/4231/2003/Н5N1) в 2003 г. в г. Шантой в провинции Гуандун (Китай). По некоторым генам генотипы вируса незначительно отличаются друг от друга. Так, изоляты генотипов V, Z и Y имеют > 98% гомологии по гену NA, а генотипы V, Z, Z+ и Y имеют > 98% гомологии по гену NS. Гомология > 98% наблюдается по сегменту 7 среди изолятов генотипов V, Z, Z+ и W, по сегменту 1 среди изолятов генотипов Y, B, C, A, E, D, Z, Z+, V и по сегменту 2 среди изолятов генотипов Y, Z, W, V, Z, Z+, A и B. Изолят A/peregrine Falcon/HK/D0028/2004/Н5N1 можно отнести к генотипу Z, так как по всем сегментам он наиболее близок к изолятам этого генотипа (см. рис. 2—9). Следовательно, изоляты группы Цинхай (включая российские), по всей видимости, могли появиться в результате реассортации изолята А/Н5N1 генотипа V (подобного изоляту A/Ck/ST/4231/2003/Н5N1), приобретя от него гены HA и NP, и изолята А/Н5N1 генотипа Z (подобного изоляту A/Falcon/HK/D0028/2004/Н5N1), получив от него все остальные сегменты генома. Также нами были проанализированы последовательности сегментов, кодирующие внутренние белки (M1, M2, NP, PA и PB2), на наличие специфичных для организма человека аминокислот, которые не были обнаружены.

Результаты выполненных исследований позволяют сделать вывод о том, что эпизоотия гриппа у диких и домашних птиц в июле—декабре 2005 г. обусловлена высокопатогенным вирусом гриппа А/Н5N1, возникшим в Китае в результате реассортации циркулировавших в резервуарах диких и домашних птиц вирусов, относящихся к генотипам Z и V, и распространившимся затем по территории Казахстана, России, Украины и ряда европейских стран.

В выделенных изолятах вируса зарегистрирован ряд молекулярных маркеров, свидетельствующих о высокой патогенности данных вариантов для домашних птиц и млекопитающих, однако эпидемиологический потенциал в отношении человека у них невелик ввиду отсутствия специфических мутаций гемагглютиниана, обеспечивающих высокую степень сродства вируса к рецепторам человека, и отсутствия характерных для организма человека генов внутренних белков.

На основании анализа молекулярных маркеров чувствительности (резистентности) этих изолятов к ранее разработанным лекарственным препаратам можно сделать вывод о том, что циркулировавшие

на территории России в 2005 г. варианты вируса гриппа А/Н5N1 чувствительны к ремантадину, однако среди них присутствовал вариант, имеющий мутацию резистентности к озельтамивиру (Тамифлю). В случае возникновения новой волны эпидемии или эпидемии гриппа с целью разработки правильной тактики противоэпидемических мероприятий, профилактики и лечения инфицированных людей необходимо проводить регулярный молекулярно-генетический анализ изолятов для определения субтипа, степени патогенности, а также на предмет наличия мутаций адаптации к организму человека и резистентности выделенных изолятов к противовирусным препаратам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д. К., Ямникова С. С., Федякина И. Т. и др. // *Вопр. вирусол.* — 2004. — Т. 49, № 3. — С. 17–25.
2. Онищенко Г. Г., Шестопалов А. М., Терновой В. А. и др. // *Докл. РАН.* — 2006. — Т. 406, № 2. — С. 278–280.
3. Шипулин Г. А., Яцышина С. Б., Подколзин А. Т. и др. // *Инфекц. бол.* — 2005. — Т. 3, № 4. — С. 25–29.
4. Abed Y., Goyette N., Boivin G. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2005. — Vol. 49, N 2. — P. 556–559.
5. Baigent S. J., McCauley J. W. et al. // *Virus Res.* — 2001. — Vol. 79. — P. 177–185.
6. Bright R. A., Medina M. J., Xu X. et al. // *Lancet.* — 2005. — Vol. 366. — P. 1175–1181.
7. Bright R. A., Shay D., Bresee J. // *CDC Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* — 2006. — Vol. 55, N 2. — P. 44–45. <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5502.pdf>
8. de Jong M. D., Thanh T. T., Khanh T. // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353, N 25. — P. 2667–2672.
9. Geiss G. K., Salvatore M., Tumpey T. M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99, N 16. — P. 10736–10741.
10. Guan Y., Peiris J. S. M., Lipatov A. S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99, N 13. — P. 8950–8955.
11. Guan Y., Poon L. L. M., Cheung C. Y. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101, N 21. — P. 8156–8161.
12. Hatta M., Gao P., Halfmann P. et al. // *Science.* — 2001. — Vol. 293. — P. 1840–1842.
13. Hien T. T., Liem N. T., Dung N. T. // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350, N 12. — P. 1179–1188.
14. Hulse D. J., Webster R. G., Russell R. J. et al. // *J. Virol.* — 2004. — Vol. 78. — P. 9954–9964.
15. Ilyushina N. A., Govorkova E. A., Webster R. G. // *Virology.* — 2005. — Vol. 341, N 1. — P. 102–106.
16. Kumar S., Tamura K., Nei M. // *Briefings in Bioinformatics.* — 2004. — Vol. 5. — P. 150–163.
17. Lee C., Suarez D. L., Tumpey T. M. // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79, N 6. — P. 3692–3702.
18. Lee M. S., Chang P. C., Shien J. H. et al. // *J. Virol. Meth.* — 2001. — Vol. 97. — P. 13–22.
19. Li K. S., Guan Y., Wang J. et al. // *Nature.* — 2004. — Vol. 430. — P. 209–213.
20. Lin Y. P., Shaw M., Gregory V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97, N 17. — P. 9654–9658.
21. Lipatov A. S., Andreatsky S., Webby R. J. // *J. Gen. Virol.* — 2005. — Vol. 86. — P. 1121–1130.
22. McKimm-Breschkin J., Trivedi T., Hampson A. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2003. — Vol. 47. — P. 2264–2272.
23. Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73. — P. 1146–1155.

24. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N. et al. // *J. Virol.* — 2000. — Vol. 4, N 18. — P. 8502–8512.
25. Matrosovich M., Matrosovich T., Gray T. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101, N 13. — P. 4620–4624.
26. Members of WHO Global Influenza program and collaborating lab. // *Emerg. Infect. Dis.* — 2005. — Vol. 11, N 10. — P. 1515–1521. www.cdc.gov/eid.
27. Moscona A. // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353, N 25. — P. 2633–2636.
28. The National Training Course on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. — Harbin, China (May 20–26, 2001). — Harbin, 2001.
29. Obenauer J. C., Denson J., Mehta P. K. // *Science.* — 2006. — Vol. 311, N 5767. — P. 1576–1580.
30. Potter C. W. // *J. Appl. Microbiol.* — 2001. — Vol. 91. — P. 572–579.
31. Shinya K., Hamn S., Hatta M. et al. // *Virology.* — 2004. — Vol. 320. — P. 258–266.
32. Songyang Z., Fanning Z., Fu C. // *Science.* — 1997. — Vol. 275. — P. 73–77.
33. Stevens J., Blixt O., Tumpey T. M. // *Science.* — 2006. — Vol. 312. — P. 404–410.
34. Subbarao K., Shaw M. W. // *Rev. Med. Virol.* — 2000. — Vol. 10. — P. 337–348.
35. Vines A., Wells K., Matrosovich M. et al. // *J. Virol.* — 1998. — Vol. 72, N 10. — P. 7626–7631.
36. Wagner R., Wolff T., Herwig A. et al. // *J. Virol.* — 2000. — Vol. 74, N 14. — P. 6316–6323.
37. Wang C., Takeuchi K., Pinto L. H. et al. // *J. Virol.* — 1993. — Vol. 67. — P. 5585–5594.
38. WHO. H5N1 avian influenza: timeline. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_15.02.pdf
39. Zhou N. N., Senne D. A., Landgraf G. // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73, N 10. — P. 8851–8856.

Поступила 15.11.06

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE INFLUENZA VIRUS A/H5N1 STRAINS ISOLATED DURING OUTBREAK OF AVIAN INFLUENZA AMONG BIRDS IN THE EUROPEAN PART OF RUSSIA IN 2005: STRAIN WITH OZELTAMIVIR-RESISTANCE MUTATION WAS FOUND

S. B. Yatsyshina¹, A. M. Shestopalov², V. A. Evseyenko², T. S. Astakhova¹, S. I. Braslavskaya¹, V. A. Ternovoi¹, T. Yu. Kondratieva¹, A. Yu. Alekseev², S. I. Zolotykh², Y. N. Rassadkin², A. V. Zaikovskaya², A. G. Durymanov², S. V. Netesov², and G. A. Shipulin¹

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow; ²State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region

Isolation and characterization of the influenza virus A/H5N1 strains, isolated from chicken in the Yandovka village (Tula Region) and from wild swan near the orifice of the Volga River that died during an outbreak of avian flu in autumn 2005, were carried out. Genetic and phylogenetic analyses were performed. The goals of the analysis were to determine possible geographical origin of the strain, genetic similarity of isolated strains to earlier sequenced isolates, epidemic potential, existence of pathogenicity markers, and resistance to antiviral drugs. It was shown that the isolated influenza virus belonged to highly pathogenic variants of China origin by a reassortment of viruses genotypes Z and V circulated in poultry and wild birds. A number of molecular markers of pathogenicity to gallinaceous birds and mammals were found out. Mutations in the hemagglutinin gene promoting potentially high rate of replication in humans as well as mutations causing the resistance to amantadine/rimantadine were not found. The strain isolated from wild swan had the mutation causing resistance to tamiflu/ozeltamivir.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 577.212.3+578.821

М. В. Кулак, Н. А. Нетесова, П. А. Белагин, Е. В. Серегина, Г. М. Игнатъев

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА КОРИ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Научоград Кольцово, Новосибирская область

В работе описано получение рекомбинантных белков гН (нуклеокапсидный) и гН/Нh (гемагглютинин) вируса кори штамма NovO/96 генотипа А. Проведена оценка иммунобиологических свойств белка на панели положительных и отрицатель-

ных сывороток. Выявлено взаимодействие антител в иммуноферментном анализе (ИФА) с рекомбинантными белками гН и гН/Нh с сыворотками доноров, переболевших вирусом кори. Мышей линии Balb/c иммунизировали рекомбинантными бел-