

**Г. А. ШИПУЛИН,  
И. Л. ОБУХОВ,  
А. Н. ПАНИН**

**АПРОБАЦИЯ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ  
И ПРОВЕДЕНИЕ  
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА  
ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА  
ПТИЦ H5N1 ВО ВРЕМЯ  
ЭПИЗООТИИ 2005 ГОДА**



В НАСТОЯЩИЙ МОМЕНТ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ОБЕСПОКОЕННОСТЬ вызывает распространение в мире эпизоотий высокопатогенного гриппа птиц. Впервые эта проблема привлекла всеобщее внимание в 1997 г., когда масштабная эпизоотия высокопатогенного гриппа в Гонконге была приостановлена только выбраковкой всей популяции птиц. Большинство экспертов ВОЗ считают, что эти меры, вероятно, предотвратили пандемию. В 2003—2004 гг. вновь была зарегистрирована крупная эпизоотия гриппа в странах Юго-Восточной Азии, где в течение нескольких месяцев было уничтожено более 100 млн домашних птиц. В этот же период отмечались случаи заболевания птиц гриппом в Италии, Голландии, Бельгии и Германии. За время этих вспышек было уничтожено около 50 млн домашних птиц.

С мая 2005 г. в странах Юго-Восточной Азии началась новая эпизоотия, вызванная высокопатогенным вирусом гриппа А субтипа H5N1, которая быстро распространилась на другие страны. В мае—июле 2005 г. в 25 км от границы с Восточным Казахстаном ветеринарные врачи Китая зафиксировали более тысячи случаев заболевания птичьим гриппом диких гусей. С 22 июля в Республике Казахстан была зарегистрирована эпизоотия гриппа птиц типа H5 с заболеванием около 3 тыс. птиц. С 7 июля 2005 г. эпизоотия гриппа птиц впервые зарегистрирована в России на территории Сибирского и Уральского федеральных округов в 51 населенном пункте. С 1 по 7 августа отмечали гибель пере-

летних птиц в Монголии. Затем падеж домашних птиц был зарегистрирован в Тульской области 14 октября, а с 17 октября случаи заболевания отмечались в Турции, Румынии, Греции. 14 ноября был отмечен падеж 200 диких лебедей в Астраханской области. С середины ноября – начала декабря началась эпизоотия гриппа птиц в Крыму. В личных подворьях граждан заболевание наблюдалось у кур, уток, гусей и индеек.

С целью проведения филогенетического анализа нами были секвенированы практически полноразмерные сегменты генома вируса, кодирующие гемагглютинин и нейраминидазу, изолятов из 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) вирус наиболее близок вирусу гриппа А H5N1, 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 [1]. Гомология секвенированных нами изолятов A/goose/Novosibirsk/4/2005 (H5N1), A/chicken/Tula/10/2005 (H5N1), A/swan/Astrakhan/1/2005 (H5N1), A/chicken/Crimea/1/2005 (H5N1) и изолятов от диких водоплавающих птиц с озера Цинхай (например, A/Bar-headed goose/Qinghai/12/05(H5N1)), а также изолятов от диких птиц из Монголии (например, A/Bar-headed goose/Mongolia/1/05(H5N1)) по гену гемагглютинина составила от 99,2 до 99,5% (рис. 1), и по гену нейраминидазы от 99,5 до 99,7% (рис. 2).

Филогенетический анализ по гену гемагглютинина изолятов птичьего гриппа H5N1 эпизоотий 1997, 2003, 2004 и 2005 гг. в Азии отражает их группировку в три основные клада, характерные для определенных не перекрывающихся

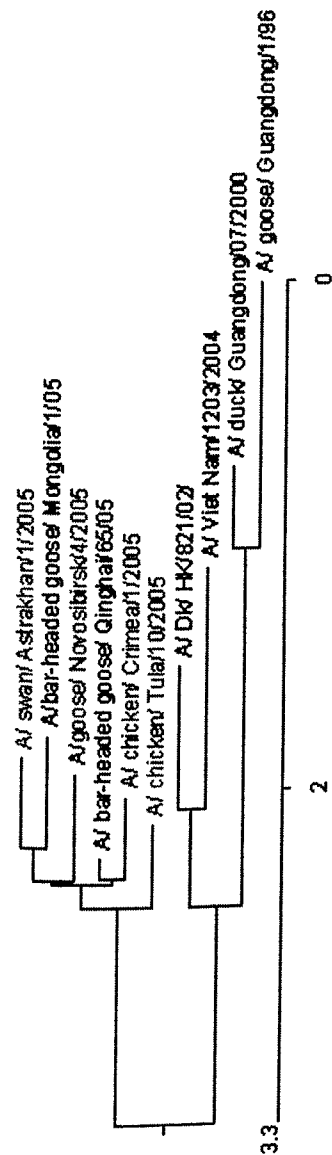


Рис. 1. Дендрограмма по гену гемагглютинина

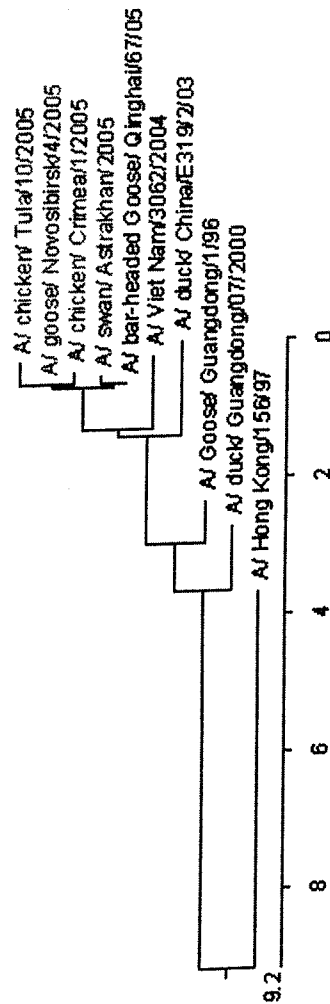


Рис. 2. Дендрограмма по гену нейраминидазы

географических регионов Азии. Так, 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 1 и 3 клайдам [2]. Обнаруженные во время эпизоотии 2005 г. на территории России и Крыма изоляты по нуклеотидной последовательности гена гемагглютинина следует отнести ко второму клайду (см. вклейку, рис. 3), для представителей которого не были характерны случаи смертельного исхода среди людей в Азии за 1997–2005 гг. Следует также отметить, что циркулирующий в данной эпизоотии вирус содержит несколько характерных маркеров: последовательность сайта протеолиза гемагглютинина, кодирующую 6 основных аминокислот (PQGERRRKRR/GL) (см. вклейку, рис. 4), которая ассоциирована с высоким индексом патогенности для домашних птиц [3], делецию в гене нейраминидазы (20 аминокислот в позиции 49–68) (см. вклейку, рис. 5), что является маркером адаптации вируса к организму птиц, а также видо-специфичный для птиц участок связывания гемагглютинина с сиаловыми рецепторами.

По данным Всемирной организации здравоохранения, с декабря 2003 г. по 16 декабря 2005 г. в мире зарегистрировано 139 лабораторно подтвержденных случаев инфицирования людей вирусом гриппа птиц А/Н5N1, из них 71 – с летальным исходом. В условиях угрозы развития пандемии для быстрой оценки эпизоотологической и эпидемической ситуаций и своевременного введения санитарно-карантинных мероприятий для предотвращения распространения инфекции актуальна разработка и внедрение эффективных методов экспресс-диагностики этого заболевания.

Основными способами лабораторной диагностики гриппа птиц в нашей стране являются выделение вируса в развивающихся куриных эмбрионах с последующим определением гемагглютинирующей активности и идентификация субтипов в реакции торможения гемагглютинации с типоспецифическими сыворотками, а также определение индекса патогенности методом биопробы на цыплятах. Эти методы идентификации субтипов отличает большая продолжительность (до двух недель), относительно низкая чувствительность и специфичность (возможны как ложно-положительные, так и ложно-отрицательные результаты). Также проводится мониторинг антител против вируса гриппа А, однако в случае инфицирования высокопатогенным вирусом гриппа птиц серологическая диагностика практически невозможна, так как заболевание протекает молниеносно (24–48 часов), в то время как уровень антител достигает диагностического титра через несколько дней после появления симптомов заболевания. ВОЗ для диагностики гриппа птиц рекомендует проводить вирусологическое исследование с верификацией выделенных культур методами иммунофлуоресценции с моноклональными антителами к вирусу гриппа А определенного субтипа. В частности, для идентификации субтипа Н5 рекомендована тест-система WHO Infl-Reagent kit [4], а также метод ПЦР с амплификацией специфических участков гена гемагглютинина типа 5 и нейраминидазы типа 1 с последующим секвенированием фрагментов амплификации. На сегодняшний момент в мире не существует ни одной зарегистрированной диагностической ПЦР тест-системы для идентификации субтипов вируса гриппа А.

В связи с этим в ФГУН ЦНИИ эпидемиологии совместного с ВГНКИ с 2003 г. велась разработка ПЦР тест-систем с различными вариантами детекции продуктов ПЦР для обнаружения РНК вируса гриппа А с последующей идентификацией наиболее значимых на данный момент субтипов. Для ветеринарных служб разработана и производится тест-система

«ГРИПП», позволяющая обнаруживать РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтипы Н5 и Н7 с использованием как электрофоретического способа детекции, так и гибридационно-флуоресцентной детекции в формате реального времени и после окончания ПЦР (с помощью детекторов Ala-1 и Джин). Последний из упомянутых способов позволяет сократить время анализа, а также обеспечить более высокую аналитическую чувствительность с сохранением специфичности теста и автоматизировать интерпретацию результатов анализа. Тест-система показала высокую специфичность на различных типах биологического материала, а также на 12 штаммах вируса гриппа А (А/черноголовый хохотун/Астрахань/1421/79 (Н13N2), А/индюк/Висконсин 1/66 (Н9N2), А/индюк/Онтарио/6118/69 (Н8N4), А/утка/Германия/1215/73 (Н2N3), А/утка/Чехословакия/56 (Н4N6), А/утка/Англия/56 (Н11N6), А/утка/Альберта60/76 (Н12N5), А/утка/Украина/1/63 (Н3N8), А/утка/Альберта35/76 (Н1N1), А/индюк/Массачусетс/3740/65 (Н6N2), А/цыпленок/Германия/49 (Н10N7), А/крачка/Ю. Африка/61 (Н5N3), А/утка/вирус чумы птиц/Росток/34 (Н7N1), А/свинья/1976/31 (HSW1N1), А/утка/Потсдам/1402-6/86 (Н5N2)) и на штаммах других вирусных и бактериальных возбудителей респираторных заболеваний животных (реовирус, вирус инфекционного бронхита кур (ИБК «Чапаевский», ИБК МВА-6, ИБК Н-120, ИБК АМ, М-4), парамиксовирусы 1 и 2 типов, вирус инфекционного ларинготрахеита, вирус болезни Марека, вирус болезни Гамборо, *Mycoplasma gallisepticum*). Аналитическая чувствительность при детекции сигнала в режиме реального времени и «по конечной точке» составила  $1 \times 10^3$  геномных эквивалентов в 1 мл тестируемого образца (ГЭ/мл), а при электрофоретической детекции —  $5 \times 10^3$  ГЭ/мл. При оценке аналитических характеристик диагностической методики, рекомендованной ВОЗ, для выявления штаммов с 5-м типом гемагглютинина была выявлена низкая аналитическая чувствительность данного теста: в частности, при тес-

тировании рекомбинантного положительного контрольного образца аналитическая чувствительность составляла всего  $1 \times 10^5$  ГЭ/мл, что ниже данных нашего теста в 20–100 раз. В процессе комиссионных испытаний тест-системы «Грипп» было показано, что с ее помощью можно обнаружить РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтип Н5 в суспензии штамма А/крачка/Ю. Африка/61/Н5N3 с инфекционным титром  $8,0 \lg$  ЭИД50/см<sup>3</sup> в разведении  $10^{-9}$ , то есть чувствительность составляет 0,1 ЭИД50/см<sup>3</sup>. Аналогичные результаты были получены при тестировании штамма А/Утка/вирус чумы птиц/Росток/34/Н7N1. Чувствительность по обнаружению РНК вируса гриппа А и идентификации субтипа Н7 составила 0,1 ЭИД50/см<sup>3</sup>. Тест-система «ГРИПП» была рекомендована к регистрации в РФ на расширенном заседании научно-проблемных методических комиссий по контролю и стандартизации биологических лекарственных средств для животных, применяемых при бактериальных, грибковых и вирусных болезнях, от 14 октября 2003 г., была включена в Государственный заказ и в количестве 600 наборов поставлена в региональные и районные ветеринарные центры для проведения мониторинга за гриппом птиц на территории РФ.

Для учреждений системы эпиднадзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека разработана тест-система «АмплиСенс Influenza virus H5» на основе гибридационно-флуоресцентной детекции, позволяющая обнаруживать РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтип Н5N1. Аналитическая и диагностическая специфичность тест-систем при работе с клиническим материалом от людей оценивалась при тестировании 50 образцов мазков из носоглотки от взрослых доноров и 30 образцов мазков из носоглотки детей без симптомов ОРЗ, а также с гетерологичными возбудителями респираторных заболеваний человека (штамм вируса гриппа В — В/Токио/53/2000; штаммы аденовируса человека — 3, 5, 6, 7, 37, 40 типов; штамм

респираторно-синцитиального вируса «Лонг» тип А; штамм вируса парагриппа 1 (Сендай), 2 и 3 типов; штаммы бактериальных возбудителей ОРЗ человека: *Haemophilus influenzae* тип В, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*; клинические изоляты: коронавирус человека групп ОС43 и E229; респираторно-синцитиальный вирус тип А и В; вирус парагриппа тип 1В и 2, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*). В результате тестирования не было зарегистрировано положительных либо сомнительных результатов. Все штаммы гриппа А, выделенные от людей (А/Кумамото/102/2002 (H3N2), А/Ленинград/549/80 (H2N2), А/Киев/3304/84 (H5N1), А/Гонконг/03 (H5N1), А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Гонконг/1073/99 (H9N2)) были идентифицированы как грипп А. Не было зарегистрировано перекрестных реакций в тесте по идентификации субтипа H5N1. Тест-система «АмплиСенс Influenza virus H5» успешно прошла Государственные испытания, после чего была рекомендована к регистрации и использованию в системе санэпиднадзора.

За период с 27 июля по 14 декабря 2005 г. на трех базах (ФГУП ГНЦ ВВ «Вектор», ФГУ ВГНКИ и ФГУН ЦНИИЭ) проведена апробация вышеупомянутых тест-систем на материале от больных и павших птиц (кур, гусей, домашних и диких уток, индоуток, лебедей) в период эпизоотии гриппа птиц на территории Сибирского федерального округа, со вспышек в Тульской и Астраханской областях, а также на территории АР Крым. Исследованию подвергались образцы селезенки, трахей, легких и мозга, фекалии и мазки из клоаки. В общей сложности было исследовано 173 образца из частных хозяйств Сибирского федерального округа, Тульской области, АР Крым и 1498 образцов из 155 птицефабрик Архангельской, Астраханской, Белгородской, Брянской, Владимирской, Вологодской, Ивановской, Калужской, Кировской, Костромской, Кур-

ской, Московской, Мурманской, Нижегородской, Омской, Оренбургской, Пензенской, Пермской, Ростовской, Рязанской, Самарской, Смоленской, Тамбовской, Тверской, Тульской, Ярославской областей, Ставропольского края, Санкт-Петербурга и республик Башкортостан, Кабардино-Балкария, Карелия, Коми, Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Чувашия. Во всех образцах от павших птиц из частных хозяйств с территории Сибирского федерального округа (155 образцов) и из д. Яндовка Тульской обл. (8 образцов) была обнаружена РНК вируса гриппа А и идентифицирован субтип H5N1. В 7 из 10 исследованных образцов от 7 птиц из Крыма был обнаружен вирус гриппа А и идентифицирован субтип H5N1. В одном случае при тестировании трех образцов органов (печень, легкие, мозг) живой курицы, контактировавшей с павшими, вирус был обнаружен только в образце легких, в другом случае в объединенном образце от павшей утки (печень, легкие, мозг) неоднократно наблюдалось ингибирование ПЦР (отсутствовал сигнал амплификации внутреннего контрольного образца).

Таким образом, у 6 из 7 подвергшихся тестированию птиц была обнаружена РНК вируса гриппа H5N1, а результаты тестирования проб от одной павшей утки не подлежат интерпретации. Исследован патматериал от павших лебедей из Астраханской области (2 объединенных образца), в котором также была обнаружена РНК вируса гриппа А и идентифицирован субтип H5N1. Ни в одном из образцов, поступивших с птицефабрик от клинически здоровых птиц (1498 образцов), не была обнаружена РНК вируса гриппа А. Ни один из этих образцов также не дал положительных результатов в тестах по идентификации субтипов H5, H7 или N1 вируса гриппа А. Результаты электрофоретической детекции при использовании тест-системы «Грипп» во всех случаях совпадали с результатами гибридационно-флуоресцентной детекции.

Для подтверждения положительных результатов ПЦР было проведено секвенирование амплифицированных фрагментов кДНК, полученных с помощью тест-систем из образцов Новосибирской и Тульской областей. Результаты секвенирования показали, что обнаруженный в образцах материала вирус гриппа А относится к субтипу H5N1. Для получения дополнительного подтверждения секвенированы продукты, полученных амплификацией с праймерами, рекомендованными ВОЗ для выявления гемагглютинина H5 и нейраминидазы N1, и с праймерами на другие локусы этих генов. Секвенирование подтвердило, что обнаруженный в образцах материала вирус гриппа А относится к субтипу H5N1. 10 положительных в ПЦР образцов из Омской области и 2 образца из Астраханской области параллельно были исследованы с помощью выделения вируса в развивающихся куриных эмбрионах с последующим серологическим анализом (РГА-РТГА) с использованием панели специфических антисывороток. Результаты данного исследования также показали наличие в этих образцах вируса гриппа серогруппы H5.

#### Выводы

1. Разработанные ПЦР тест-системы позволяют выявлять РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтипы H5 или H7 и субтип H5N1 с высокой чувствительностью в материале от животных, людей и в кормах, причем для диагностики можно использовать материал как от павших, так и от живых птиц.
2. Тест-система «ГРИПП» была рекомендована к регистрации в РФ (ТУ 9388-116-00494189-03) и в количестве 600 наборов поставлена по Государственному заказу в региональные и районные ветеринарные Центры для проведения мониторинга за гриппом птиц на территории РФ.
3. Тест-система «АмплиСенс Influenza virus H5/N1» успешно прошла Государственные испытания (№ ФС 42-015-

723905) и рекомендована к использованию в системе сан-эпиднадзора.

4. Тест-системы «АмплиСенс Influenza virus H5» и «ГРИПП-Флю» предпочтительны для первичного скрининга на ВГП-А подтипа 5 в сравнении с обычным вариантом ОТ-ПЦР, так как предотвращают контаминацию фрагментами ПЦР, обеспечивают высокую скорость анализа и автоматизацию регистрации результатов.

#### Литература

1. Liu J., Xiao H., Lei F. et al. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds // Science. 2005. Vol. 309. P. 1206.
2. Группа представителей ВОЗ. Evolution of H5N1 Avian influenza viruses in Asia // Emerging infectious diseases. Vol. 11. N. 10. P. 1515–1521.
3. Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses // Science. 2001. Vol. 293. P. 1840–1842.
4. WHO Manual on Animal influenza of diagnosis and surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS, 2002. [http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_NCS\\_2002\\_5/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/)

Г. А. Шипулин, И. Л. Обухов, А. Н. Панин  
**АПРОБАЦИЯ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ И ПРОВЕДЕНИЕ  
 ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГРИППА  
 ПТИЦ H5N1 ВО ВРЕМЯ ЭПИЗООТИИ 2005 ГОДА**

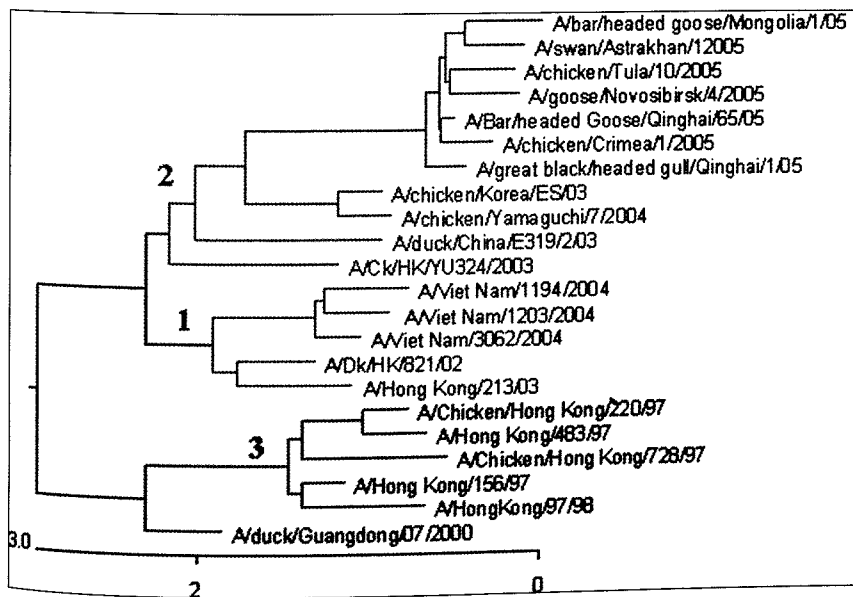


Рис. 3. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинина (HA). Зеленым цветом выделены последовательности, группирующиеся в клайд 1, синим цветом выделены последовательности, группирующиеся в клайд 2, черным цветом показаны последовательности, группирующиеся в клайд 3





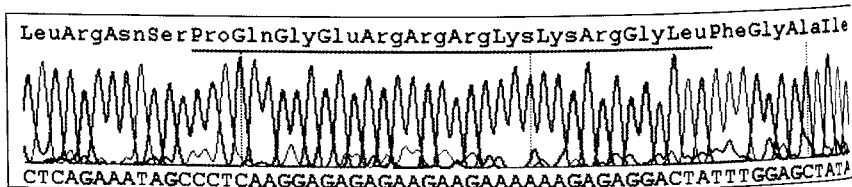


Рис. 4. Район сайта протеолитического расщепления молекулы гемагглютинаина (PQGERRRKKR/GL).

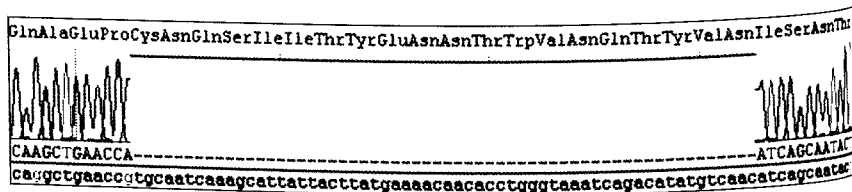


Рис. 5. Нуклеотидная последовательность гена нейраминидазы. Подчеркиванием выделена делеция 20 аминокислот в позиции 49-68.