

- Лекции по инфекционным болезням / Под ред. Н. Д. Ющука, А. Д. Царегородцева. — М., 1996.
- Павлова О. М. Клинико-иммунологические особенности бруцеллеза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ростов н/Д., 2004.
- Попов П. Н., Павлова О. М. // Тезисы докладов Научной конф. "Узловые вопросы борьбы с инфекцией". — СПб., 2004. — С. 158—159.
- Попов П. Н., Павлова О. М. // Тезисы докладов Научной конф. "Инфекционные болезни". — СПб., 2006. — С. 254—255.
- Попов П. Н., Павлова О. М., Санникова И. В. // Вестн. Север. Кавказа (Ставрополь). — 2007. — № 4. — С. 45—47.
- Руднев Г. П. Бруцеллез. — М., 1955.
- Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней / Под ред. В. И. Покровского. — М., 1993. — Т. 2. — С. 170—182.
- Яровой Л. В. Клиника, диагностика и лечение бруцеллеза овечьего-козьего типа в различных фазах болезни: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Ставрополь, 1964.

Поступила 12.05.08

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.921.5-078

С. Б. Яцышина¹, А. Н. Миненко¹, М. Н. Прадед¹, П. В. Волошина¹, С. В. Трушак ова², С. И. Браславская¹, Е. И. Бурцева², Г. А. Шипулин¹, В. В. Малеев¹, В. И. Покровский¹

ДИАГНОСТИКА ГРИППА: НОВЫЙ ВАРИАНТ А/Н1N1 В РОССИИ

¹ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, Роспотребнадзора; ²ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва

С целью быстрой оценки эпидемической ситуации на пороге и во время пандемии и своевременного введения санитарно-эпидемиологических мероприятий для предотвращения или ограничения распространения инфекции актуальны разработка и внедрение эффективных методов быстрой диагностики гриппа. В ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора разработаны наборы реагентов для проведения ПЦР, позволяющие обнаруживать РНК вирусов гриппа А и В и идентифицировать эпидемически значимые субтипы. Оценили аналитические и диагностические параметры наборов реагентов и апробировали их на клиническом материале во время эпидемического подъема гриппа. Обнаружены первые случаи заболевания гриппом А/Н1N1 нового варианта в России. Проведены исследования по оценке эпидемического потенциала вирусов А/Н1N1 нового варианта с помощью молекулярно-генетических методов.

Ключевые слова: диагностика гриппа, ПЦР.

S. B. Yatsyshina¹, A. N. Minenko¹, M. N. Praded¹, P. V. Voloshina¹, S. V. Trushakova², S. I. Braslavskaya¹, Ye. I. Burtseva², G. A. Shipulin¹, V. V. Maleyev¹, V. I. Pokrovsky¹

DIAGNOSIS OF INFLUENZA: A NEW VARIANT OF A/H1N1 IN RUSSIA

¹Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare; ²D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The development and introduction of effective methods for the rapid diagnosis of influenza are urgent for the prompt assessment of the epidemic situation on the threshold of and during its pandemic and for the timely implementation of sanitary and epidemiological measures in order to prevent or restrict the spread of the infection. The Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, has designed polymerase chain reaction reagent kits that detects influenza viruses A and B RNA and identifies epidemiologically significant subtypes. The analytical and diagnostic parameters of reagent kits were estimated and tested on clinical materials during the epidemic surge of influenza. The first cases of influenza A/H1N1 of the new variant have been detected in Russia. Investigations have been under way to estimate the epidemiological potential of A/H1N1 viruses of the new variant, by applying molecular genetic methods.

Key words: influenza diagnosis, polymerase chain reaction.

Интенсивная миграция населения в сочетании с активной эволюцией вирусов гриппа создают предпосылки для возникновения новых антигенных вариантов вирусов гриппа и их быстрого глобального распространения. По данным ВОЗ, с марта 2009 г. в Мехико в рамках эпиднадзора стали регистрироваться случаи гриппоподобного заболевания, число которых устойчиво возрастало. На 23 апреля было зарегистрировано уже 854 случая заболе-

вания, 59 из которых закончились смертельным исходом. К 24 апреля 2009 г. стало очевидным, что заболевание вышло за пределы одной страны: правительство США сообщило о 7 случаях заболевания людей гриппом (5 в Калифорнии и 2 в Техасе), вызванным новым вариантом вируса гриппа А/Н1N1 с гемагглютинином свиного происхождения [7]. Вследствие вовлечения в эпидемический процесс большого числа стран и регистрации случаев заболевания вспышечного характера [3] 11 июня 2009 г. эксперты ВОЗ объявили о начале пандемии (6-я фаза пандемического процесса). По данным на 9 июля 2009 г., уже 121 страна мира на разных континентах сообщили о 94 512 случаях заболевания, вызванного новым антигенным вариантом вируса гриппа А/Н1N1, включая 163 летальных исхода. На этой стадии пандемического процесса наряду с другими мерами, эффективным и существен-

ным является раннее распознавание случаев инфицирования. В связи с этим крайне востребованы средства быстрой диагностики гриппа с возможностью типирования.

В ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ) разработаны наборы реагентов для выявления РНК вируса гриппа А и В и типирования вирусов гриппа А, в том числе обнаружения нового варианта А/Н1N1 методом ПЦР с гибридоизационно-флюоресцентной детекцией. Данный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью и позволяет получить достоверный результат в течение одного рабочего дня. С помощью разработанных наборов реагентов и методов молекулярно-генетического анализа обнаружены и изучены первые случаи заболевания новым вариантом гриппа А/Н1N1 в России.

Материалы и методы

Использованные штаммы и изоляты. В работе использовали штаммы, выделенные от животных из коллекции ФГУ ВГНКИ: вирус гриппа А субтипов Н13N2, Н9N2 (А/Индюк/Висконсин/1/66, А/Swine/Hong Kong/9/98), Н8N4, Н2N3, Н2N9, Н3N2, Н3N8, Н4N6, Н11N6, Н12N5, Н1N1, Н6N2, Н10N7, Н5N3, Н7N1 (А/FPV/Rosstock/34), HSWIN1, Н5N2, Н5N3 (А/Кракча/Ю. Африка/61-Н5N3); инактивированные суспензии эпидемических штаммов из лаборатории экологии и эпидемиологии гриппа ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, из Центра гриппа ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь и Украинского центра гриппа и острых респираторных инфекций (26 штаммов субтипа Н1N1, 23 штамма субтипа Н3N2, выделенные с 1977 по 2008 гг. в России, Украине и Республике Беларусь): А/Ленинград/549/80 (Н2N2), А/Киев/3304/84 (Н0N1), А/Гонконг/03 (Н5N1), А/Гонконг/1073/99 (Н9N2); штаммы вируса гриппа В: В/Токио/53/2000, В/Moscow/18/07 (Ямагата), В/Moscow/15/07 (Виктория); штаммы возбудителей острых респираторных заболеваний (ОРЗ) человека, полученные из ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора: аденовирусы человека 3, 5, 6, 7, 37, 40-го типов, респираторно-синцитиальный вирус "Лонг", вирусы парагриппа 1—4-го типов, риновирусы человека 13, 15, 16, 17, 21, 26, 29-го типов, энтеровирусы человека Coxsackie В1, В2, В3, В4, В5, В6; Polio 1, 11, 111, изоляты коронавируса человека ОС43, Е229, НКU1 и NL63; штаммы и клинические изоляты бактериальных возбудителей ОРЗ человека: *Haemophilus influenzae* тип b, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumoniae*; клинические образцы, содержащие *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomydia pneumoniae*. Для оценки специфичности использовали следующий биологический материал: мазки из носоглотки взрослых без симптомов ОРЗ (100 образцов), мазки из носоглотки и ротоглотки детей без симптомов ОРЗ (200 образцов).

Использованные методики и оборудование. Экстракцию РБК, реакцию обратной транскрипции, ПЦР и ПЦР с гибридоизационно-флюоресцентной детекцией проводили с использованием реактивов производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора ("РИБО-сорб", "РИБО-преп" и "РЕ-ВЕРТА-Л"). Методы клонирования ДНК использовали для конструирования положительных и внутреннего контрольных образцов, представляющих собой бактериофаги ms2, содержащие фрагменты генома вирусов гриппа и последовательность гена gag, наличие которой позволяет определять концентрацию рекомбинантных препаратов с использованием количественного теста AMPLICOR HIV MONITOR ("Roche"). Таким образом, сконструировали препараты, содержащие детектируемые участки генома вирусов гриппа (кодирующие белок М1 вируса гриппа А и протеин NS гриппа В), и образец, содержащий синтезированный с помощью методов ген-

ной инженерии специфический детектируемый участок последовательности гена гемагглютинина изолята *Influenza virus A*, аналогичный А/California/04/2009 (Н1N1), что было подтверждено секвенированием ДНК. Для амплификации гена гемагглютинина вирусов гриппа А линии Classical swine, к которой относятся изоляты, подобные А/California/04/2009 (Н1N1), предложены праймеры (F: 5'-tgg cga tct att caa ctg teg cca g-3', R: 5'-ctg tag aga ccc att asa gca cat cca-3') и олигонуклеотидный зонд (5'-ccc cag gga gac tac cag tac ctg-3'), содержащий флюорофор R6G и гаситель флюоресценции ВHQ1. ПЦР с гибридоизационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени (FRT) проводили на приборах Rotor Gene-6000 ("Corbett Research", Австралия). ПЦР с детекцией по конечной точке (FEP) — на Gene Amp-2700 (Applied "Biosystems", США), Террик ("ДНК-Технология", Россия). Детекцию по конечной точке проводили на приборе ALA-1/4 ("BioSan", Латвия). Для секвенирования использовали праймеры, образующие в процессе амплификации набор перекрывающихся фрагментов ДНК. Фрагменты амплификации секвенировали на базе ЦНИИЭ методом cycle sequence 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). Нуклеотидные последовательности выравнивали с использованием блока программ DNASTAR по алгоритму Clustal.

Результаты и обсуждение

Описание разработанных тестов. С целью совершенствования диагностики и мониторинга гриппа разработан ряд наборов реагентов для обнаружения РНК вируса гриппа А и В (отдельно) и идентификации наиболее эпидемически значимых субтипов вируса гриппа А. Сконструированные флюоресцентные зонды позволяют проводить детекцию в режиме как FRT, так и FEP. Набор реагентов "АмплиСенс *Influenza virus A/B-FL*" обнаруживает РНК вирусов гриппа А всех субтипов и вирусов гриппа В, относящихся к линиям Ямагата и Виктория. Набор реагентов для ПЦР "АмплиСенс *Influenza virus A-тип-FL*" позволяет идентифицировать в мультипраймерном формате из двух реакционных пробирок (Н1N1 и Н3N2) гемагглютинин субтипов Н1 и Н3 и нейраминидазы субтипов N1 и N2 последовательностей изолятов, выделявшихся в мире во время ежегодных эпидемий последних 30 лет. Набор реагентов для ПЦР "АмплиСенс *Influenza virus A/H1-swine-FL*" разработан с целью идентификации последовательности гена гемагглютинина вирусов гриппа А линии Classical swine, которые антигенно отличаются от вирусов сезонного гриппа А/Н1. Набор реагентов для ПЦР "АмплиСенс *Influenza virus A/H5, H7, H9-FL*" идентифицирует в мультипраймерном формате субтипы вирусов гриппа Н5, Н7, Н9. Именно к этим субтипам относились высокопатогенные штаммы, вызывавшие масштабные эпизоотии гриппа у животных, во время которых были зарегистрированы заболевания людей (Гонконг: Н9N2 — 1998—1999 гг.; Нидерланды Н7М7 — 2003 г., Н5N1 — с 2005 г. по настоящее время), в ряде случаев со смертельным исходом [11]. Кроме того, в ЦНИИЭ разработаны и производятся наборы реагентов для проведения всех необходимых этапов анализа: экстракции РНК и постановки обратной транскрипции. В комплекты реагентов для ПЦР входят образцы, тестирование которых позволяет контролировать адекватность выполнения всех процедур анализа, занимающего 4—5 ч. Наборы реагентов могут быть использованы при тестировании клинического материала от человека (мазки из респираторного тракта, мокрота и аспираты из трахеи, секционный материал) и культуральной жидкости, полученной при вирусологических исследованиях. Проведены госу-

Для корреспонденции:

Яцышина Светлана Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Адрес: 111123 Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а
Телефон: (8-495) 974-96-46
E-mail: syatsyshina@pcr.ru

дарственные испытания и получены регистрационные удостоверения на изделия медицинского назначения для наборов реагентов "АмплиСенс A/B-FL" и "АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL".

Оценка аналитических характеристик разработанных тестов. Исследовали аналитическую специфичность и чувствительность наборов реагентов. Аналитические характеристики "АмплиСенс Influenza virus A/B-FL" и "АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL" оценивали совместно с сотрудниками лаборатории экологии и эпидемиологии гриппа ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН. Аналитическую чувствительность тестов оценивалась трехкратным тестированием разведений рекомбинантных положительных контрольных образцов с известной концентрацией и вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с известной инфекционной активностью. Использовали следующие штаммы: В/Москва/29/08 (7 lg TCID₅₀/мл), А/Москва/19/08 (H1N1) 5,5 lg TCID₅₀/мл, А/Москва/36/08 (H3N2) 5,33 lg TCID₅₀/мл. Выявили, что разработанные наборы реагентов позволяют обнаружить РНК вируса гриппа А и идентифицировать субтип H1N1 по гемагглютинирующей и нейраминидазе в суспензии с инфекционной активностью 0,03 lg TCID₅₀/мл, идентифицировать субтип H3N2 в суспензии с инфекционной активностью 0,02 lg TCID₅₀/мл и обнаружить РНК вируса гриппа В в суспензии с инфекционной активностью 1 lg TCID₅₀/мл. При исследовании набора "АмплиСенс Influenza virus A/H5, H7, H9-FL" использовали суспензии штаммов с известной инфекционной активностью, полученные из ФГУ ВГНКИ, и разведения рекомбинантных положительных контрольных образцов с известной концентрацией. Установлено, что набор реагентов выявляет РНК вирусов гриппа и идентифицирует типы гемагглютинина в суспензии штамма А/Кракча/Ю. Африка/61/H5N3 с инфекционным титром 8,0 lg ЭИД₅₀/см³ в разведении 10⁻⁹ и в суспензии штамма А/Утка/вирус чумы птиц/Росток/34/H7N1 с инфекционным титром 8,0 lg ЭИД₅₀/см³ в разведении 10⁻⁹. Набор для идентификации гемагглютинина 5, 7 и 9-го типов вируса гриппа А обнаруживает 1000 геномных эквивалентов РНК вируса каждого субтипа в 1 мл тестируемого образца. Аналитическую специфичность тестов оценивали на мазках из респираторного тракта, полученных от 200 детей и 100 взрослых без симптомов ОРЗ. Ни в одном из образцов вирусы гриппа А и В не были обнаружены. Сомнительные результаты также отсутствовали. Ложноположительных, ложноотрицательных либо сомнительных результатов зарегистрировано не было. Перекрестные реакции при постановке титрующих тестов отсутствовали. Эффективность работы набора реагентов для идентификации гемагглютинина H1 свиного происхождения дополнительно оценивали с использованием изолятов А/California/04/2009 (H1N1) и А/California/07/2009 (H1N1) и изолятов эпидемического гриппа субтипа H1 с высокой вирусной нагрузкой (порядка 10⁸ геномных эквивалентов в 1 мл ВСЖ). Ложноположительные либо сомнительные результаты отсутствовали. Показано, что набор реагентов "АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL" идентифицирует штаммы А/California/04/2009 (H1N1) и А/California/07/2009 (H1N1) по гемагглютинирующей 1-го типа как положительные и по нейраминидазе 1-го типа как отрицательные.

Оценка диагностических характеристик разработанных тестов. Оценивали диагностическую чувствительность совместно с ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН путем сравнительных исследований методом ПЦР и выделения вирусов гриппа на клетках ткани МДСК из клинического материала, собранного во время эпидемического сезона гриппа 2007–2008 гг. на базе первой 1-й инфекционной клинической больницы (ИКБ) Москвы. Для изоляции вируса в культуре использовали носоглоточные смывы в вирусологической транс-

портной среде, а для ПЦР — мазки в транспортной среде для респираторных мазков, собранные от каждого пациента из разных носовых пазух. Исследовали 74 образца от детей в возрасте от 4 мес до 11 лет. Процент обнаружения вирусов разными методами практически совпал. Вирусы гриппа А обнаружили в 19 (25,7%) образцах методом ПЦР и в 15 (20,3%) при изоляции вируса в культуре. Вирусы гриппа В обнаружили в 20 (27%) образцах методом ПЦР и 21 (28,4%) образце при изоляции вируса в культуре. При этом в 2 образцах методом ПЦР были обнаружены как вирус гриппа А, так и В.

Исследование случаев, подозрительных на наличие гриппа, вызванного новым вариантом вируса А/H1N1. В референс-центре по мониторингу за инфекциями верхних и нижних дыхательных путей ЦНИИЭ с 28 апреля по 4 июня проводили первичное исследование случаев, подозрительных на инфицирование новым вариантом вируса А/H1N1, и подтверждение положительных результатов первичного исследования, полученных в ряде центров Госсанэпиднадзора. Исследовали клинический материал (мазки из носоглотки и ротоглотки) от пациентов с подозрением на грипп А/H1N1, выявленный медицинскими службами при пересечении границы или самостоятельно обратившихся за медицинской помощью, а также контактировавших с лицами, инфицированными вирусом гриппа А/H1 свиного происхождения. В общей сложности исследовали клинический материал от 42 человек. Исследования проводили с помощью разработанных наборов реагентов. В Российской Федерации случаи инфицирования вирусом гриппа А/H1 свиного происхождения стали обнаруживать с 21 мая 2009 г. Первый случай при депонировании в GeneBank был обозначен А/Moscow/01/2009 (H1N1): прибывший из США гражданин России, сообщивший о наличии гриппоподобного заболевания у сотрудников по месту его временной работы в университете Нью-Йорка (США). 16 мая у больного появился сухой кашель, недомогание, головная боль. Однако фебрильная лихорадка была отмечена лишь с 19 мая, когда одновременно усилился кашель, отмечался озноб, заложенность носа с периодическими слизистыми выделениями. Больной был госпитализирован в бокс инфекционной больницы 21 мая. При рентгенологическом исследовании выявили усиление сосудистого и интерстициального рисунка, особенно прикорневых отделов легких. При исследовании на грипп методом иммунофлюоресценции получили отрицательный результат. Проводили лечение озельтамивиром (тамифлю) по 75 мг 2 раза в день. Заболевание протекало благоприятно, больной был выписан в удовлетворительном состоянии на 4-й день терапии. Второй положительный образец от путешествовавшего в Доминиканскую Республику — А/Kaluga/01/2009 (H1N1) — был доставлен для подтверждения из Центра Госсанэпиднадзора по Калужской области. Третий случай — А/Moscow/02/2009 (H1N1) обнаружили у гражданки Белоруссии, прибывшей в Москву из Италии, где она длительно проживала. Еще один случай — А/Moscow/03/2009 (H1N1) — обнаружили у прибывшей в Москву студентки университета Стэнфорда (США). У 1 пациента выявили РНК вируса гриппа с очень низкой вирусной нагрузкой (материал от пациента собрали на 5-й день заболевания), при этом тест с набором "АмплиСенс Influenza virus A/B-FL" дал отрицательный результат, что говорит о более высокой чувствительности теста по идентификации гриппа А/H1-swine. В группе обследованных людей, контактировавших с больными, вирусы гриппа обнаружены не были (результаты всех тестов отрицательные).

Молекулярно-генетический анализ РНК нового варианта вируса А/H1N1, выявленного в клиническом материале. Специфичность положительных результатов ПЦР была подтверждена секвенированием фрагментов ПЦР, полученных непосредственно из клинического материала.

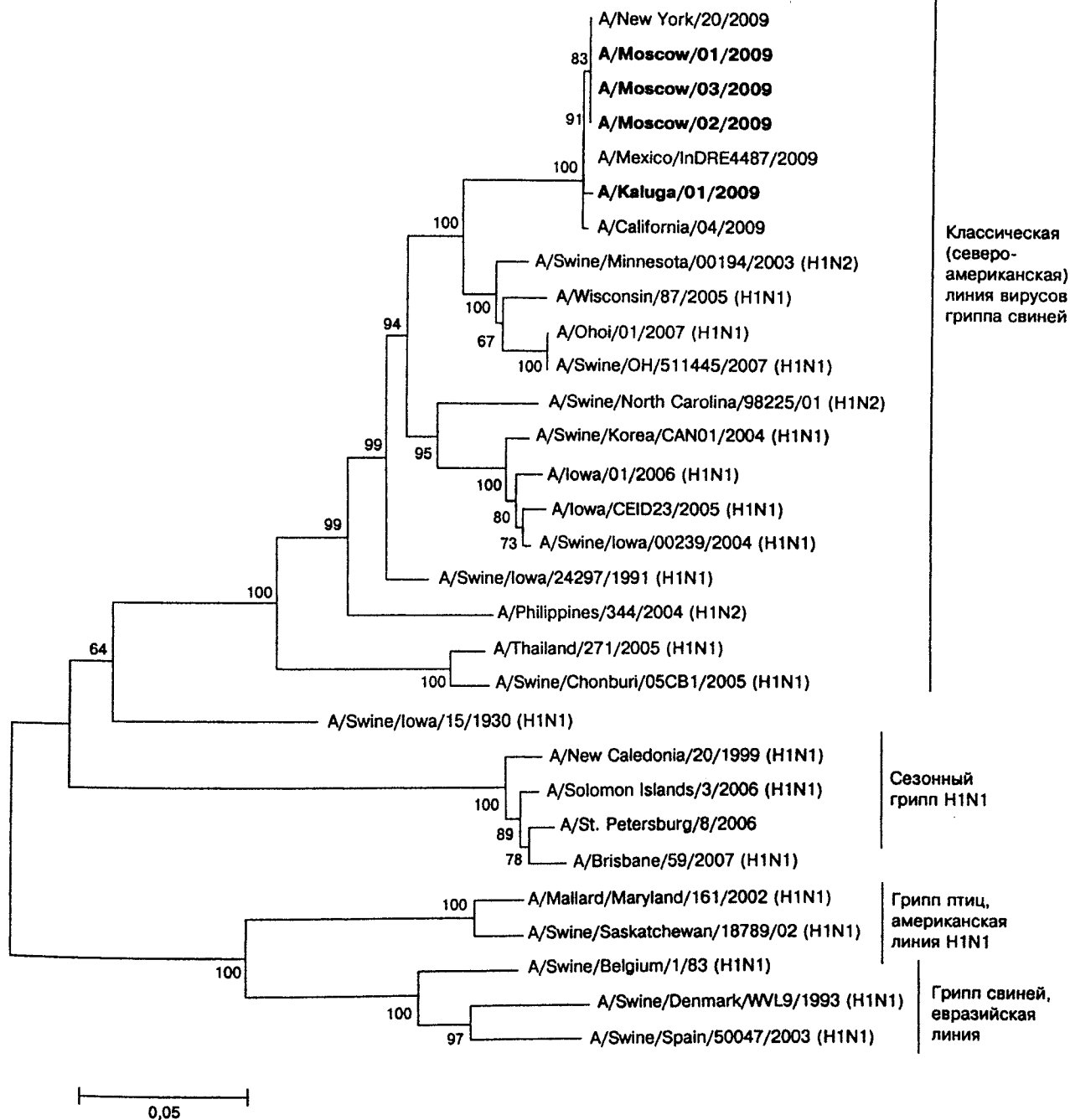


Рис. 1. Филогенетическое дерево по гену гемагглютиниона (HA-1698 п. н.).

Жирным шрифтом выделены последовательности, секвенированные в данном исследовании.

Последовательности нуклеотидов депонировали в базу данных GeneBank под номерами GQ184628—GQ184630 и GQ255897—GQ255901. Установлено, что фрагменты принадлежат вирусу гриппа А субтипа H1N1, имеющему высокую гомологию с изолятом A/California/04/2009 (H1N1). Результаты сравнения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей представлены на рис. 1—4 и в табл. 1, 2). Сравнение полученных последовательностей гена гемагглютиниона с депонированными на данный момент в GeneBank показало, что вирусы группируются в кластер последовательностей вируса гриппа

H1 классической (северо-американской) линии вируса гриппа свиней (см. рис. 1). При этом последовательности гена нейраминидазы группируются в кластер вирусов гриппа евразийской линии вируса гриппа свиней (см. рис. 2). Таким образом, новый вирус представляет собой реассортант как минимум двух антигенных линий вирусов, длительно эволюционировавших отдельно в организмах свиней и не имеющих близкого родства с сезонными вирусами гриппа человека. Детальный молекулярно-генетический анализ показал, что последовательности российских изолятов имеют сайт протеолиза гемагг-

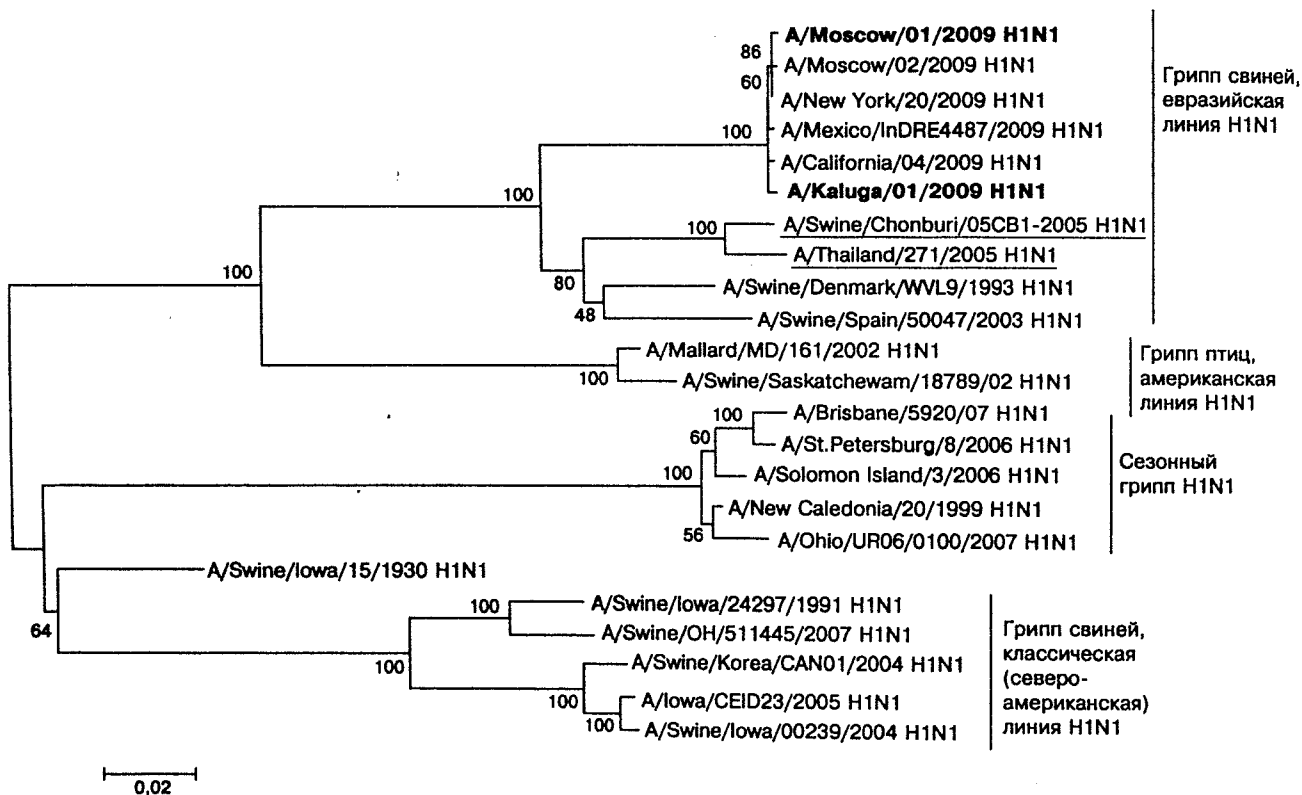


Рис. 2. Филогенетическое дерево по сегменту 6 (ген NA) (1335 п. н.).

Жирным шрифтом выделены последовательности, секвенированные в данном исследовании. Подчеркнуты последовательности, относимые по гену гемагглютинина в кластер классических изолятов вирусов гриппа свиней.

лутинина PSIQR/GL, как и большинство изолятов нового варианта A/H1N1, представленных в GeneBank, за исключением изолята A/Guangdong/03/2009 (H1N1), имеющего сайт PSILSR/GL. Таким образом, все последовательности сайта протеолиза гемагглютинина содержат только одну основную аминокислоту, что свидетельствует о низком индексе патогенности вируса, тогда как наличие от 4 до 6 основных аминокислот ассоциировано с высоким индексом патогенности для птиц отряда куриных и млекопитающих [4]. Однако изоляты различаются с сезонными H1, для которых характерна последовательность PSIQYR/GL.

Исследование области связывания гемагглютинина с сиаловыми рецепторами, характеризующей видовую приспособленность [5], показало, что у всех российских изолятов вируса в ключевых положениях представлены аминокислоты имеющие высокое сродство к рецепторам респираторного тракта свиней. Так-

же в популяции вирусов нового варианта представлены изоляты, имеющие в позициях 225-ю и 226-ю аминокислоты (E и R), характерные для сезонного гриппа человека и не характерные для свиней (см. табл. 2). Подобные изоляты были выделены в Мексике, США, Финляндии и Франции. Этот факт требует детального изучения и может свидетельствовать о генетической и эпидемической неоднородности циркулирующих вирусов, например, по их трансмиссивности.

В целом исследованные изоляты вирусов гриппа A/H1N1 характеризуются высокой гомологией (в пределах 99,5–100%) по наиболее вариабельным генам HA и NA, что отражают дендрограммы (см. рис. 3, 4), зарегистрированы единичные аминокислотные различия, перечисленные в табл. 3. Изолят, выделенный у пациента, прибывшего из Доминиканской Республики, различался с остальными изолятами четырьмя—пятью аминокислотами по белку гемагглютинина, тремя аминокислотами по

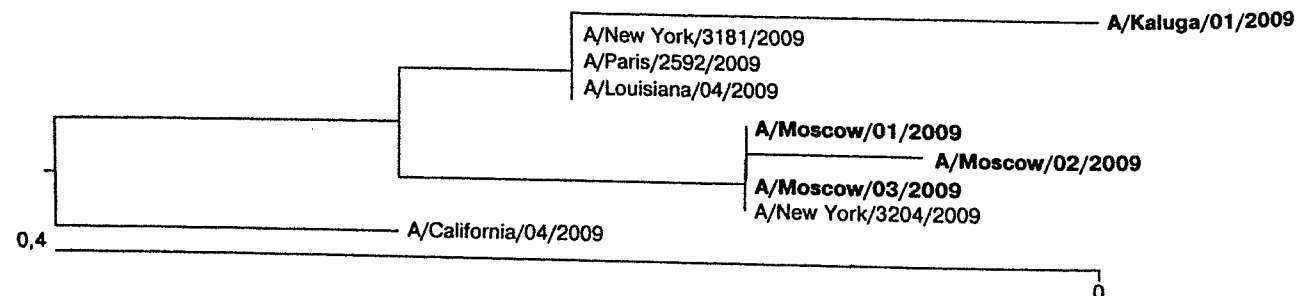


Рис. 3. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинина (HA-1698 н. п.).

Жирным шрифтом выделены последовательности, секвенированные в данном исследовании.

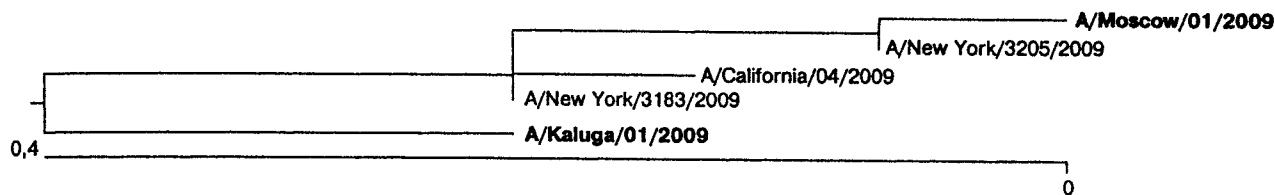


Рис. 4. Филогенетическое дерево по сегменту 6 (ген NA) (1335 п. н.).

Жирным шрифтом выделены последовательности, секвенированные в данном исследовании.

белку нейраминидазы и одной аминокислотой по белку M2.

Среди депонированных в GeneBank последовательностей насчитывается 57 различных аминокислотных замен по протеину NA, что составляет не более 10% от полного размера протеина, и 31 замена по белку NA (7% от размера протеина). Следовательно, значительной антигенной вариабельности среди циркулирующих вирусов к настоящему моменту не наблюдается. Исследование резистентности к противогриппозным препаратам показало, что у всех представленных в GeneBank изолятов, включая российские, имеются маркеры резистентности к ремантадину. Маркеров резистентности к тамифлю и арбидолу в исследованных последовательностях обнаружено не было.

Основными способами лабораторной диагностики гриппа в России являются выделение вируса в культуре MDCK и на РКЭ с последующим определением активности гемагглютинации и идентификация субтипов в реакции ее торможения с типоспецифическими сыворотками. Данные способы отличаются трудоемкостью и продолжительностью, и во многом зависят от качества нестандартизованных реагентов. Доступные тесты для типирования по нейраминидазе отсутствуют. Высокая мутационная активность и склонность вирусов гриппа к реассортации вызывают необходимость постоянного обновления существующих типоспецифических сывороток, что заставляет сомневаться в специфичности проводимых исследований. Примером этого является появление нового варианта вируса гриппа А субтипа H1N1, который невозможно было идентифицировать существующими иммунологическими методами, поэтому CDC для его диагностики рекомендовал использовать валидированные тесты ПЦР или проводить вирусологическое исследование с верификацией выделенных культур методами ПЦР с последующим секвенированием фрагментов амплификации ДНК. CDC рекомендовал использовать тесты для обнаружения в ПЦР РНК вирусов гриппа А и В и определения гемагглютининов H1, H3 и H5. Типирование нейраминидазы не предусмотрено, что не позволяет обнаруживать возникающие реассортанты по нейраминидазе.

Тесты, разработанные в ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора позволяют идентифицировать как гемагглютинины (H1 и H3), так и нейраминидазу (N1 и N2) сезонных штаммов. Применение

ПЦР позволит сократить продолжительность и объем лабораторных исследований, так как данные по обнаружению и типированию вирусов гриппа в клиническом материале будут доступны уже в 1-е сутки исследований. При получении положительного результата при скрининге клинического материала методом ПЦР целесообразно провести типирование методом ПЦР и посев положительного в ПЦР материала с последующим серологическим исследованием культуры с учетом уже имеющихся результатов ПЦР-типирования. Во время ежегодного эпидемического подъема гриппа целесообразно использовать набор реагентов для идентификации сезонных вариантов вируса гриппа H1N1 и H3N2. Если в этом случае образец не типруется по одной из мишеней (NA или NA), то материал должен направляться в референс-лабораторию для дальнейшего исследования. Если имеются сведения о путешествии в страну, где регистрируются случаи заболевания гриппом нового варианта А/H1N1, следует использовать тест для идентификации данного субтипа. Применение подобного алгоритма позволит повысить количество высеваемых штаммов гриппа, что расширит возможности изучения циркулирующих на территории Российской Федерации вариантов и позволит быстро обнаруживать появление новых субтипов. Внедрение разработанных тестов в лабораторную систему Роспотребнадзора позволило своевременно наладить мониторинг нового варианта гриппа А/H1N1 в России.

Эволюция вирусов гриппа имеет динамический и сложный характер. В истории ее изучения обнаруживались реассортанты, как сезонных вирусов с образованием новых субтипов (H1N2) [1], так и вирусов, циркулировавших изолированно в популяции птиц и свиней [8], птиц и людей [9], людей и свиней [11]. В последние годы регистрировались тройные реассортанты (triple-reassortant), несущие в геноме сегменты вирусов, принадлежащих к линиям вирусов гриппа птиц, свиней и людей [10]. Высокая гомология изолятов, выделенных в Мексике, США и ряде других стран, вероятно, свидетельствует о появлении нового варианта вируса в популяции людей в результате одномоментного события. Однако вследствие плохой организации мониторинга гриппа у свиней недостаточно данных для однозначного установления временных рамок и подробностей этого события. За период наблюдения с 1958 по 2009 г. в разных странах, включая США, сообщалось о 60 случаях инфицирования вируса-

Таблица 1

Ключевые аминокислоты в области связывания гемагглютинаина с сигнальными рецепторами

Грипп	Номер аминокислоты по H3							
	138	158	159	189	225	226	227	228
Swine classic H1	A	G	N, S	D	N, G, D	Q, L	A, E	G, S
Human H1	S	N	GT, S	D	E, D	L, R	E	S
A/N1N1-Sw H1	A	G	N	D	D, G, E (3*)	Q, R (3*)	E	G
A/N1N1-SwH1 в Российской Федерации	A	G	N	D	D	Q	E	G

Примечание. * — количество изолятов с данной аминокислотой.

Сравнение аминокислотных последовательностей ключевых протеинов

Ген, позиция	Консенсус	Moscow/01	Moscow/02	Moscow/03	Kaluga/01	Galifornia/04
HA:						
49	L	L	L	L	I	L
100	S	S	S	S	S	P
214	A	A	A	A	A	T
220	S	T	T	T	S	S
251	V	V	V	I*	V	V
338	V	T	T	T	S	S
477	I	I	I	I	V*	I
NA:						
106	V/I	I	нд	нд	V	V
248	N/D	D	нд	нд	N	N
451	D	G*	нд	нд	D	D
M2:						
10	P	P	нд	нд	H	P

Примечание. * — уникальные аминокислоты, нд — нет данных.

ми свиного гриппа людей, контактировавших со свиньями [6]. Однако в последние месяцы Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) не сообщало о случаях заболевания свиней в США, Мексике либо в других регионах. Более того, 2 мая 2009 г. на сайте МЭБ появилось сообщение из Канады о заражении свиней на ферме в Альберте вирусом нового варианта A/H1N1 от заболевшего работника, приехавшего незадолго до этого из Мексики. Кроме того, в отличие от ранее обнаруженных случаев гриппа свиного происхождения, когда вирус не передавался дальше от человека к человеку, новый вариант A/H1N1 обладает высокой трансмиссивностью в популяции людей (репродуктивный коэффициент 1,2-1,6): чуть выше, чем у сезонного гриппа (репродуктивный коэффициент 1,3), но ниже границы, рассчитанной для пандемического штамма 1918 г. (репродуктивный коэффициент 2-5) [2, 6]. Патогенность вируса невысокая. По данным ВОЗ, в госпитализации нуждаются до 9% пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом, смертность в среднем не превышает 1% (в Мексике около 2%).

Молекулярно-генетический анализ изолятов не выявил в геноме изолятов нового варианта вируса маркеров высокой вирулентности, однако не стоит забывать о способности вирусов гриппа к реассортации и высокой скорости мутационного процесса. В связи с этим, несмотря на отсутствие случаев распространения нового вируса гриппа на территории Российской Федерации, целесообразно усилить эпиднадзор за необычными вспышками гриппоподобных заболеваний и пневмониями неясного генеза.

* * *

Авторы выражают благодарность Центру гриппа ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь и Украинскому центру гриппа и острых респираторных инфекций за предоставленные для

работы инактивированные суспензии штаммов вирусов гриппа, выделенных на территориях данных стран, а также ИКБ № 1 (Москва), территориальным управлениям и центрам Госсанэпиднадзора по Калужской области, по Москве и Московской области за сотрудничество в работе по исследованию случаев подозрения на грипп свиного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ellis J., Alvarez-Aguero A., Gregory V. // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 9, N 3. — P. 304-310.
2. Fraser C., Donnelly C., Cauchemez S. // Sciencexpress. org. — 2009. — 11 May.
3. Jordan H., Mosquera M., Nair H., France A. // MMWR Morbid. Mortal. Wkly Rep. — 2009. — Vol. 58 (Dispatch). — P. 1-3.
4. Liu J., Xiao H., Lei F. et al. // Science. — 2005. — Vol. 309. — P. 1206.
5. Matrosovich M. et al. // J. Virol. — 2000. — Vol. 74, N 18. — P. 8502-8512.
6. Mossad S. // Clev. Clin. J. Med. — 2009. — Vol. 76. — P. 337-343.
7. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) virus investigation team. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361. — P. 1-10.
8. Schmidtke M., Zell R., Bauer K. et al. // Intervirology. — 2006. — Vol. 49. — P. 286-293.
9. Scholtissek C., Rohde W., Von Hoyningen V. // Virology. — 1978. — Vol. 87. — P. 13-20.
10. Shinde V., Bridges C., Uyeki T. // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361. — P. 1-10.
11. Webby R., Rossow K., Erickson G. et al. // Virus Res. — 2004. — Vol. 103. — P. 67-73.
12. World Health Organization avian Influenza: timeline. [Electronic resource] — Access mode: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/timeline.pdf.

Поступила 31.07.09